ZUR BESTIMMUNG VON ADRENALIN UND NORADRENALIN IN KLEINEN PLASMAVOLUMINA

HANS-BERND GRÜBL

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0085

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

ZUR BESTIMMUNG VON ADRENALIN UND NORADRENALIN IN KLEINEN PLASMAVOLUMINA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Bernd Grübl

aus
München

1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Riegel

Mit berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.1972

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	5
II. Grundriß der Physiologie und Pathophysiologie des adreno-sympathischen Systems	6
1. Biosynthese, Speicherung, Freisetzung und Inaktivierung der Katecholamine	6
2. Abbau	7
3. Funktionen	9
4. Hormonwirkungen	9
5. Pathophysiologie	11
6. Besonderheiten in der Neugeborenenperiode	12
III. Methoden zum Katecholaminnachweis	16
1. Biologische Methoden	16
2. Chemische Methoden	16
a. Äthylendiamin-Methode (EDTA-Methode)	17
b. Trihydroxyindol-Methode (THI-Methode)	17
IV. Beschreibung der eigenen Methode	20
1. Material und Reagenzien	20
2. Blutentnahme	22
3. Vorbereitung der Ionenaustauschersäulen	22
4. Säulenpassage	23
5. Elution	23
6. Nachweisreaktion	23
7. Messung	25
8. Berechnung	25
9. Beispiel	27
V. Ergebnisse und Diskussion	27
1. Steigerung der Empfindlichkeit	27
2. Die optimale Cu^{++} Konzentration	28
3. Die Wirkungen der Cu^{++}	29
4. Errechnete Empfindlichkeit der Methode	33

5. Säulenpassage 34
6. Waschen des Harzes 34
7. Vergleich verschiedener Kationenaustauscherharze 35
8. Harzmenge und Elutionsvolumen 39
9. Leerwerte 40
10. Leerwertfehler beim nicht oxydierten Leerwert 41
11. Wiederfindung 41
12. Verluste durch das Enteiweißen des Plasmas 42
13. Verluste durch das Neutralisieren 43
14. Meßgenauigkeit 44
15. Reproduzierbarkeit 44
16. Linearität 44
17. Spezifität 44
18. Standard zur Berechnung 48
VI. Klinische Untersuchungen 49
1. Methodik 49
2. Ergebnisse 54
3. Diskussion 54
VII. Zusammenfassung 57
VIII. Literaturverzeichnis 59
IX. Lebenslauf 68

ZUR BESTIMMUNG VON ADRENALIN UND NORADRENALIN IN KLEINEN PLASMAVOLUMINA

I. Einleitung

Viele Reaktionen der Anpassung an extrauterine Bedingungen sprechen dafür, daß auch die normale Geburt für das Kind ein Stress ist. Unter pathologischen Bedingungen sind bei den meisten Risikoneugeborenen während der ersten Tage mehr oder weniger ausgeprägte Schocksymptome nachweisbar. Einen gemeinsamen "Nenner" dieser funktionellen Änderungen hat man bisher noch nicht gefunden. Von großem Interesse sind daher Untersuchungen sog. sekundärer Schockwirkungen, unter denen man nach BYRNE(15) Konzentrationsänderungen verschiedenster Substanzen, wie z.B. des Cortisols, Aldosterons, Angiotensins, Serotonins und der Katecholamine zu verstehen hat. Solche Untersuchungen sind bisher meist an technisch-methodischen Hürden gescheitert: bei Neugeborenen kann man nur Methoden benutzen, die ein kleines Blutvolumen erfordern.

Vor allem hinsichtlich der postnatalen Änderungen der Katecholamin-Konzentrationen im Blut sind viele Fragen bisher ungeklärt. Es gibt Hinweise darauf, daß diese Substanzen bei der Entwicklung lebensbedrohlicher Erkrankungen des Neugeborenen - wie z.B. beim idiopathischen Atemnotsyndrom, das etwa die Hälfte aller Frühgeborenen durchmachen muß und das mit einer Letalität von rund 25% maßgeblich an der Neugeborenenmortalität beteiligt ist (47) - große Bedeutung haben. Diese vorwiegend auf anatomisch-histologischen Befunden basierenden Hinweise (66) bedürfen der Bestätigung durch Messungen der Katecholamine im Blut, da die Katecholaminausscheidung im Urin zwar einen gewissen Anhalt für

die gebildete Menge gibt, aber keine Schlüsse auf die tatsächlich wirksamen Konzentrationen zuläßt.
Zur Bestimmung der Katecholamine hat man bisher etwa 10 ml Plasma benötigt. Ich hatte die Aufgabe, eine Methode zu entwickeln, die bei hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit die Messung der Katecholamine in kleinen Plasmavolumina ermöglicht.

II. Grundriß der Physiologie und Pathophysiologie des adreno-sympathischen Systems

1. Biosynthese, Speicherung, Freisetzung und Inaktivierung der Katecholamine

Aus l-Tyrosin bilden die Zellen des Nebennierenmarks (NNM), der sympathischen Nervenendigungen und des Gehirns in mehreren enzymatisch gesteuerten Schritten über l-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und 3,4-Dihydroxyphenylaethylamin (Dopamin) l-Noradrenalin (NA). Nur in den chromaffinen Zellen des NNM's geht die Umwandlung des NA in l-Adrenalin (A) weiter (vgl. 97 und Abb. 1).

NA und A bilden mit Adenosintriphosphat (ATP) einen Komplex, der an subzelluläre Strukturen gebunden ist. NA und A sind darin inaktiv, aber chemisch unverändert.

Aus dem NNM werden A und NA durch nervale Reizung freigesetzt und in das Blut abgegeben. Wahrscheinlich spielen Ca^{++} dabei eine Rolle (21, 94). Auch in Ruhe werden geringe Mengen A und NA abgegeben.
An den sympathischen Nervenendigungen wird als Überträgersubstanz NA freigesetzt.

Die Inaktivierung der Katecholamine erfolgt auf verschiedene Weisen:

a. Weiterbeförderung mit dem Blutstrom und damit Verdünnung am Erfolgsorgan.

b. Sofortiger enzymatischer Abbau durch die Katechol-O-methyl-transferase (COMT).
c. Wiederaufnahme in die praesynaptischen Bläschen durch aktiven Transport.

Wegen c. haben Organe mit starker sympathischer Innervation und starker Durchblutung, z.B. Herz und Milz, einen großen Gehalt an Katecholaminen, die zu etwa 20% aus dem Blut aufgenommen werden (50,72).
Für A und NA besteht eine Blut-Hirn-Schranke, sodaß das Gehirn (wahrscheinlich mit Ausnahme des Hypothalamus) keine Katecholamine aus dem Blut erhält (94).

2. Abbau (s. Abb. 1)

An Abbau und Ausscheidung der Katecholamine sind mehrere Systeme beteiligt:
a. A und NA werden durch aktiven Transport unverändert über die Niere ausgeschieden (76).
b. Nach ihrer Freisetzung aus den praesynaptischen Bläschen oder Sekretion durch das NNM werden A und NA von dem im Zytoplasma vorliegenden Enzym Katecholamin-O-methyl-transferase inaktiviert (4). Dabei wird von S-Adenosylmethionin eine Methylgruppe auf die meta-OH-Gruppe übertragen. A und NA gehen in das inaktive Metanephrin bzw. Normetanephrin über. Diese werden entweder unverändert (5,2%) oder nach Konjugation mit Schwefelsäure (29,5%) bzw. Glukuronsäure (6,0%) im Harn ausgeschieden. Sie können noch durch die Monoaminoxydase (MAO) zu Vanillinmandelsäure und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol, die ebenfalls im Harn erscheinen, desaminiert werden.
c. Das nicht freigesetzte und überflüssig gespeicherte NA (und A), sog. Pool II, wird durch die MAO oxydativ desaminiert (49). Der entstehende Aldehyd geht durch Oxydation in 3,4-Dihydroxymandelsäure und durch Reduktion in 3,4-Dihydroxyphenylglykol über. MAO ist in allen Geweben vorhanden und an die Mitochondrien gebunden (7). Die

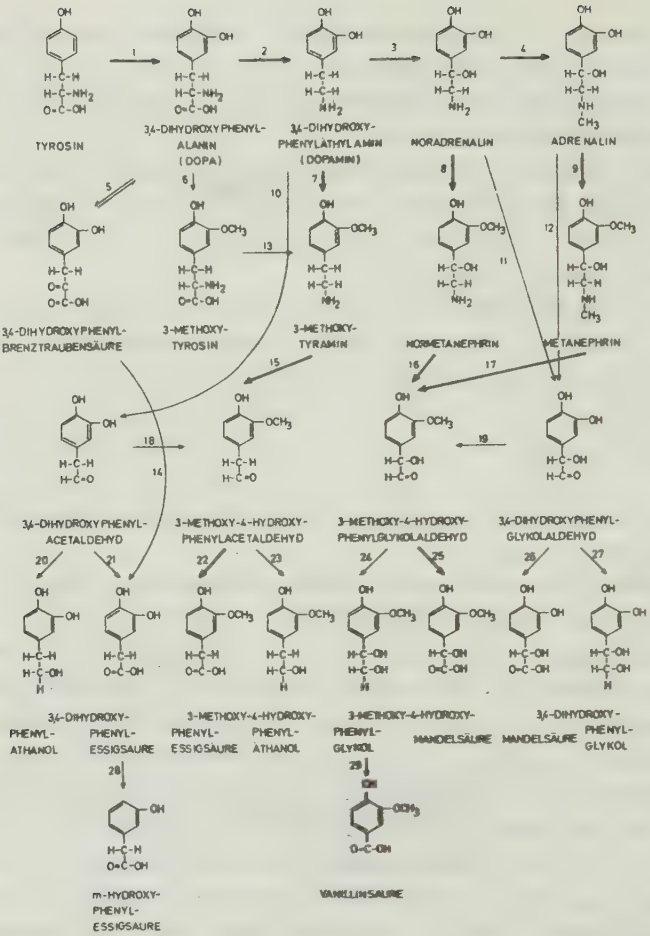

Abb. 1: Stoffwechsel der Katecholamine

Biosynthese durch die Enzyme 1: Tyrosinhydroxylase, 2: DOPA-decarboxylase, 3: Dopamin-ß-oxydase, 4: Phenylaethanolamin-N-methyl-transferase. Abbau des DOPA durch 5: eine Transaminase und 6: Katecholamin-O-methyl-transferase (COMT). Abbau der Katecholamine: 7,8,9,18,19: COMT; 10,11,12,15,16, 17: Monoaminoxydase (MAO). 13: DOPA-decarboxylase (?). 14: nur in vitro nachgewiesen. 20,23,24,27: Reduktion des Aldehyds zum Alkohol. 21,22,25,26: Oxydation des Aldehyds zur Säure. 28: nur bei Kaninchen und Ratten bekannt. 29: Dehydrierung und oxydative Decarboxylierung.

Abbauprodukte werden ebenfalls über die Niere ausgeschieden.

Besonders reich an COMT sind Leber und Niere (4), die deshalb für den Abbau der zirkulierenden Katecholamine verantwortlich gemacht werden. In letzter Zeit wurde in der menschlichen Placenta ein relativ hoher Gehalt an COMT gemessen (33), der etwa der halben Aktivität in der Leber entspricht.

3. Funktionen

NA ist Überträgersubstanz an adrenergen Synapsen und ein Hormon des NNM's. A ist hauptsächlich Hormon des NNM und möglicherweise auch Überträgersubstanz. NA und A werden unter Ruhebedingungen im Verhältnis 4 : 1 vom NNM sezerniert.

4. Hormonwirkungen

A aktiviert die Adenylatcyclase, die ATP in das zyklische 3',5'-AMP umwandelt. Dieses katalysiert die Umwandlung einer inaktiven Form der Phosphorylase-b-Kinase in eine aktive Form, die wiederum die Phosphorylierung und Dimerisierung der Phosphorylase b zur Phosphorylase a katalysiert. Diese Phosphorylase bewirkt den Abbau des Glykogens in Muskel und Leber zu Glukose-1-phosphat, was mit einem Ansteigen des Blutzuckers verbunden ist.
A steigert den Stoffwechsel aller Organe, das führt zu einem vermehrten Sauerstoffverbrauch und einer Erhöhung des Grundumsatzes. Die Körpertemperatur steigt.
Beim Stoffwechsel im Muskel entstehen in der Hauptsache Pyruvat und Laktat, das in der Leber wieder zu Glykogen rücksynthetisiert werden kann.
Auf das Fettgewebe wirkt A, wahrscheinlich durch das 3',5'-AMP, lipolytisch: die freien Fettsäuren im Blut steigen an. Die Rückveresterung der freien Fettsäuren zu Triglyceriden ist ebenfalls gesteigert. Dabei wird α-Glycerophosphat verbraucht; aus Glukose bzw. Glykogen wurde es gebildet.

NA steigert nur gering Blutzucker und Grundumsatz und wirkt nicht lipolytisch.

A hat am Herzen einen positiv inotropen Effekt. Es steigert das Herzminutenvolumen (HMV) und die Herzfrequenz.
Die Arteriolen werden durch A erweitert, die Venolen verengt. Der periphere Widerstand sinkt dadurch leicht ab, oder aber bleibt gleich, während der Blutdruck durch das erhöhte HMV gering ansteigt.

NA dagegen bewirkt eine starke Vasokonstriktion im arteriellen und venösen Gebiet und führt damit zu einer Steigerung des peripheren Widerstandes mit Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes. Das HMV steigt durch NA nicht an, die Herzfrequenz wird gesenkt. Unter physiologischen Bedingungen heben sich die Herz- und Kreislaufwirkungen von A und NA gegenseitig auf.
Die Gefäßwirkungen von A und NA sind nicht in allen Organen gleich. Während NA alle Gefäße verengt, erweitert A die Koronarien und Muskelgefäße, verengt aber Haut- und Eingeweidegefäße stärker als die Gefäße der übrigen Organe.

A und NA verengen die Gefäße des kleinen Kreislaufes. Die Bronchien werden durch A stark erweitert und durch NA leicht verengt.

Die erregenden und hemmenden Wirkungen der Katecholamine, die besonders an den glattmuskulären Organen gleichzeitig auftreten, lassen sich nicht mit einem Angriffspunkt erklären. Die Blockierung der Wirkungen gelingt nicht mit einem Antagonisten. Man nimmt deshalb an, daß die Katecholamine an verschiedenen Rezeptoren angreifen (1). Die Erregung der glatten Muskulatur wird durch α-Rezeptoren vermittelt, die Hemmung, sowie die Herz- und Stoffwechselwirkung, durch ß-Rezeptoren. A greift an α- und ß-Rezeptoren an, während NA mehr über die α-Rezeptoren wirkt.

5. Pathophysiologie

a. Unterfunktion

Zustände von Unterfunktion sind eher selten. So führt z.B. die beidseitige Adrenalektomie zu keinen Ausfallserscheinungen, wenn die Nebennierenrindenhormone substituiert werden.
Orthostatische Hypotonien können auf einer mangelnden Ansprechbarkeit des Organismus für Katecholamine (86,87) oder einer Störung der Freisetzung beruhen (30).
Als Ursache für Hypoglykämien, die bei Säuglingen postnatal auftreten können, wird eine Unterfunktion des adreno-sympathischen Systems diskutiert (52).
Bei Narkosen mit Thiopental oder Pentobarbital (38) und während der Medikation mit Reserpin (13) oder Ganglienblokkern (77) wurden verminderte Katecholaminspiegel im Plasma gemessen.

b. Überfunktion

Der bekannteste Überfunktionszustand ist das Phäochromocytom. Es ist ein gutartiger Tumor der sympathischen Ganglienzellen, der meistens NA, in einem Drittel der Fälle auch A, produziert. Die Folge sind dauernde Hypertonie oder Blutdruckkrisen, Hyperglykämie und Glukosurie.
Weit wichtiger ist die Rolle, die das adreno-sympathische System bei allen Schockformen spielt. Die beim hämorrhagischen Schock, beim Endotoxinschock, bei der Elektroschocktherapie und bei Anaphylaxie erhöhten Katecholaminkonzentrationen im Plasma bewirken eine Vasokonstriktion in der Peripherie, die die Versorgung der lebenswichtigen Organe sicherstellt. Dem gleichen Zweck dienen die gesteigerte Glykogenolyse und Lipolyse, sowie die Wirkung am Herzen.

Dauert der Schockzustand länger an, dann kommt es über Störungen der Mikrozirkulation zur Gewebshypoxie mit irreversiblen Schäden der Organfunktionen (53).

Nach Operationen und Traumen, bei Äther- und Chloroformnarkose, sowie nach Muskelarbeit, Reizung der Nn. splanchnici und bei durch Insulin hervorgerufenen Hypoglykämien wurden ebenfalls erhöhte Katecholaminwerte gemessen (25).

6. Besonderheiten in der Neugeborenenperiode

Es ist bekannt, daß das Neugeborene einen wesentlich höheren Stoffwechsel hat als der Erwachsene: sein Grundumsatz ist doppelt so groß wie der von Erwachsenen. Man muß also auch eine höhere sympathische Aktivität erwarten. Wie Messungen der Katecholaminkonzentrationen im Plasma zeigen, ist das tatsächlich der Fall. Allerdings ist bis jetzt nur eine größere Studie bekannt.
Mit der EDTA-Methode (s.u.) wurden im Plasma von normalen Neugeborenen (n = 19) 0,35 ± 0,64 µg A/l Plasma und 2,39 ± 2,69 µg NA/l Plasma gemessen (16). Im Vergleich zu Erwachsenen, bei denen mit der gleichen Methode 0,22 ± 0,27 µg A/l Plasma und 0,58 ± 0,66 µg NA/l Plasma gemessen wurden (93), sind die Werte der Neugeborenen 1 1/2 bzw. 4 mal höher.

Dabei ist zunächst zu bedenken, daß die höheren Plasmaspiegel durch vermehrte Sekretion, mangelnde Ausscheidung oder verminderten Abbau bedingt sein können. Für letzteres könnte sprechen, daß bei Neugeborenen die UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität in der Leber vermindert ist, was nicht nur zum physiologischen Ikterus der Neugeborenen führt, sondern auch an einer verminderten Paarung der Katecholamine mit Glucuronsäure beteiligt sein kann.
Außerdem kann man annehmen, daß vor der Geburt das im mütterlichen und kindlichen Blut kreisende A und NA von der Placenta inaktiviert wurde, da sie eine hohe Aktivität an COMT aufweist (33). Dieses "Klärorgan" fällt mit der Geburt weg,und kann so zum Ansteigen von A und NA im Blut von Mutter und Kind führen.
Da die Katecholamine durch aktiven Transport über die Niere

ausgeschieden werden, ist auch die Möglichkeit einer verminderten Ausscheidung gegeben.
Für eine vermehrte Sekretion spricht die Tatsache, daß das Neugeborene im Verhältnis zum Körpergewicht größere Mengen Katecholamine im Urin ausscheidet als der Erwachsene (92). Zudem besitzt das Neugeborene etwa 40 paraaortal gelegene sog. Paraganglien, die sich bald nach der Geburt zurückbilden. Sie enthalten in der Hauptsache NA (31).
Bei schweren hypoxischen Zuständen scheidet das Neugeborene nur wenig mehr A und NA im Urin aus als unter normalen Bedingungen (29,83). Bei leichten Hypoxien konnte keine vermehrte Katecholaminausscheidung gemessen werden (82).

Bei Hyperkapnie wurden die höchsten A- und NA-Werte im Urin gefunden. Die A-Ausscheidung ist dabei stärker erhöht als die NA-Ausscheidung. Nicht das erhöhte pCO_2, sondern die Acidose scheint der wesentliche Reiz für die Sekretion der Katecholamine zu sein. Das konnte bewiesen werden, indem während der CO_2-Beatmung gleichzeitig Trispuffer gegeben wurde. Es kam dabei zu keiner A- und NA-Erhöhung im Urin (40,63).
Auch der Einfluß der Umgebungstemperatur auf die Katecholaminausscheidung Neugeborener wurde untersucht (79,84). Eine erniedrigte Temperatur bewirkte eine vermehrte NA-Ausscheidung im Urin und ein Ansteigen der freien Fettsäuren im Blut (79), sowie einen erhöhten Sauerstoffverbrauch (84).
Durch Insulin erzeugte Hypoglykämien führten zu einem Ansteigen des A im Urin (32).

Im Plasma von Frühgeborenen wurden 0,86 $\pm$ 1,21 µg A/l Plasma und 3,24 $\pm$ 2,03 µg NA/l Plasma gemessen (16), also höhere Werte als für normale Neugeborene. Im Gegensatz dazu ist die NA-Ausscheidung im Urin bei Frühgeborenen gegenüber Neugeborenen auf etwa 1/3 reduziert. Die Dopaminausscheidung steigt vom ersten Tag post natum bis zum 15. Tag p.n. auf das Doppelte der Ausscheidung

von normalen Neugeborenen (69). Am 15. Tag p.n. findet sich bei den Frühgeborenen eine erhöhte Ausscheidung von Vanillinmandelsäure (VMS) und Metakatecholaminen (68). Man schloß daraus, daß die Bildung von NA aus Dopamin bei den Frühgeborenen gestört ist und Dopamin vermehrt zu VMS metabolisiert wird (69). Nach allem, was uns über den Abbau der Katecholamine bekannt ist, ist das nicht möglich (3, und Abb.1). Außerdem sind diese Informationen zu spärlich, um endgültige Schlüsse zuzulassen.

Kinder mit idiopathischem Atemnotsyndrom zeigten mit 4,06 ± 2,62 µg A/l Plasma und 5,3 ± 3,8 µg NA/l Plasma sehr hohe Konzentrationen (16). Dieser Befund scheint die Vermutung zu bestätigen, daß die hyalinen Membranen ihre Entstehung einer ungehemmten sympathischen Aktivität verdanken (59).
Durch tierexperimentelle Untersuchungen versuchte man dies zu erhärten:
Neugeborene Schweine zeigen bei A-Infusion folgende Veränderungen (17): Das Blutvolumen nimmt ab, der Hämatokrit nimmt zu, ebenso die interstitielle Flüssigkeit. Im Plasma bleibt die Na^+-Konzentration unverändert, die K^+-Konzentration ist erhöht. Die gleichen Veränderungen findet man beim Atemnotsyndrom. Dagegen wird die tierexperimentell gefundene Zunahme der Blutglukose, des Blutdrucks und der Körpertemperatur verneint.
Das häufig bei asphyktischen Kindern gefundene systolische Herzgeräusch kann mit einem sich für kurze Zeit wieder öffnenden Ductus arteriosus erklärt werden, denn bei neugeborenen Lämmern fand man, daß A und NA den Ductus arteriosus verengen, daß dieser sich aber bei Hypoxie wieder öffnet (11).
Auch andere Veränderungen beim idiopathischen Atemnotsyndrom lassen sich mit verstärkten Katecholaminwirkungen erklären. Bei frühgeborenen Lämmern fand man, daß die Lungengefäße stark verengt waren und den Blutfluß nicht aufnehmen konnten (10). Die Erweiterung der Bronchien

führt zu einer Vergrößerung des Totraumes und Minderbelüftung der Alveolen.

Durch die Acidose und Hypoxämie kommt es zu Permeabilitätsstörungen, und über ein Sludging der Erythrozyten und eine Aggregation der Thrombozyten zur plasmatischen Hyperkoagulabilität mit Ausbildung zirkulierender Fibrinmonomerer, die im weiteren Verlauf unter Verbrauch von Faktoren zu intravasalen Thromben polymerisieren. Diese Vorgänge sind zugleich an der Ausbildung der pulmonalen hyalinen Membranen beteiligt. Der für den unreifen Neonaten charakteristische Plasminogen-Mangel begünstigt dieses Geschehen (9). Der Zusammenhang mit dem adrenosympathischen System kann darin gesehen werden, daß einmal die Acidose zu einer vermehrten Ausschüttung von A führt, und daß zum anderen A zu einer Labilisierung der Gefäßwand und der Thrombozyten, sowie zur Verkürzung der Gerinnungszeit führt. Weiterhin wird die endogene Heparinbildung und -ausschüttung durch den Sympathicus gesteuert.

Neuerdings wurde beim idiopathischen Atemnotsyndrom eine verminderte Ausscheidung von A, die im Verlauf der Erkrankung noch abnimmt, beobachtet (44,85). Dazu paßt die Beobachtung, daß die Nebennieren von Kindern mit hyalinen Membranen 19% weniger wiegen als die vonKindern ohne diese Erkrankung. Die Zahl der chromaffinen Granula ist ebenfalls vermindert (66). Auf diese Befunde stützt sich die Interpretation, daß das Membran-Syndrom durch Unterfunktion des adrenosympathischen Systems bedingt ist (85). Zusammenfassend kann man sagen, daß widersprüchliche Angaben über Konzentrationen und Wirkungen der Katecholamine beim Neugeborenen vorliegen.

III. Methoden zum Katecholaminnachweis

1. Biologische Methoden

Bei den biologischen Methoden dient z.B. die Wirkung auf den Blutdruck der Ratte (20), auf den Rattenuterus (28), auf die Kaninchenaorta (41) oder auf den Hühnerdarm (46) zur Messung der Katecholamine. Man kann dabei nur den Gesamtgehalt an Katecholaminen messen, nicht aber zwischen A und NA unterscheiden. Diese Methoden sind außerdem unterschiedlich empfindlich für A und NA. So ist die Bestimmung am Rattenuterus für A 300 mal empfindlicher als für NA. Außerdem interferieren die Nachweise mit Acetylcholin, Histamin und Serotonin, so daß eine Aufarbeitung der Proben notwendig ist. Diese Art der Katecholaminbestimmung ist deshalb, und weil sich die Empfindlichkeit nicht weiter steigern läßt, weitgehend zu Gunsten der chemischen Methoden verlassen worden.

2. Chemische Methoden

Von den chemischen Nachweismethoden sind die kolorimetrische Bestimmung als Adrenochrom und die Reduktion von Arsenomolybdat bedeutungslos. Heute wird fast ausschließlich die Bestimmung stark fluoreszierender Katecholaminabkömmlinge durchgeführt. A und NA fluoreszieren zwar ebenfalls; eine wesentlich stärkere Fluoreszenz zeigen jedoch die Kondensationprodukte mit Äthylendiamin (67) und Stoffe, die durch Oxydation und Tautomerisation zu Trihydroxyindolen oder Lutinen entstehen. Die Entwicklung der fluorometrischen Methoden war unter anderem abhängig von der Entwicklung hochempfindlicher Meßgeräte. Heute stehen leistungsstarke Spektralfluorometer zur Verfügung. Mit ihnen kann jede gewünschte Anregungs- und Emissionswellenlänge eingestellt werden. Dadurch wird die Spezifität fluorometrischer Methoden

wesentlich gesteigert.

a. Äthylendiamin-Methode

Im alkalischen Milieu, in Gegenwart von Sauerstoff und beim Erwärmen auf 50° C für 20 min werden A und NA zu Adrenochrom und Noradrenochrom oxydiert. Diese kondensieren mit Äthylendiamin zu stark fluoreszierenden stabilen Produkten (14,65, 98). Die Kondensationsprodukte werden mit Isobutanol extrahiert, dann wird die Fluoreszenz der Lösung gemessen. Die Derivate von A und NA haben verschiedene Fluoreszenzspektren, was zu ihrer Unterscheidung dient. Bei einer Anregung von 420 nm wird die Fluoreszenz bei 510 und 580 nm gemessen (93).
Bei der Kondensation entsteht nicht nur jeweils ein Kondensat von A und NA, sondern mehrere (64). Außerdem erfolgt eine Spaltung der Seitenkette der Katecholamine (45). Unter den Reaktionsbedingungen kann ein Teil des A demethyliert werden und liefert dann die gleichen Reaktionsprodukte wie das NA (98,99).
Weiterhin stellte man fest, daß das NA-Derivat im Licht instabil ist (2,60), und daß Licht verschiedener Wellenlängen einen starken Einfluß auf seine Fluoreszenz hat, während das Adrenalinderivat nicht beeinflußt wird. Läßt man die Katecholamine vor der Kondensation mit Äthylendiamin eine mit Aluminiumoxyd gefüllte Säule passieren, so erhöht sich die Fluoreszenz um 100 bis 150% (89). Die Ursache dafür ist unbekannt.

b. Trihydroxyindol-Methode

Diese Methode beruht auf der Beobachtung, daß A in alkalischer Lösung eine kurzdauernde gelb-grüne Fluoreszenz zeigt (54,71). Wird A oxydiert, dann erfolgt in der Seitenkette ein Ringschluß zum Adrenochrom (8,78). Alkalisiert man jetzt die Lösung, so lagert sich das Adrenochrom zu einer stark fluoreszierenden Verbindung um (22,27,39,56), die EHRLEN (22) als 1-Methyl-3,5,6-Trihydroxyindol identifizierte. LUND (56) isolierte sie und nannte sie Adrenolutin. Für NA

und Isopropylnoradrenalin ist der Reaktionsmechanismus wahrscheinlich ähnlich (12). Er dürfte über mehrere Zwischenstufen verlaufen, die in Abb. 2 dargestellt sind. NA wird bei einem pH von 3 bis 3,5 nur wenig, aber bei einem pH von 6 bis 6,5 vollständig oxydiert (57). Die Oxydation des A ist vom pH weitgehend unabhängig (42,51). Dieses unterschiedliche Verhalten dient auch zur Differenzierung von A und NA in einem Gemisch. Ältere Versuche, die Bildung von Trihydroxyindolen zum Nachweis von A und NA zu benutzen, scheiterten hauptsächlich an der Instabilität der Lutine.

Zur Trennung des A und NA von anderen Plasma- oder Harnbestandteilen und zu ihrer Anreicherung läßt man sie an Aluminiumhydroxyd (80) oder Aluminiumoxyd oder, nach Enteiweißung des Plasmas mit Perchlorsäure, an Kationenaustauscherharze adsorbieren und eluiert sie wieder mit Säure.

Die Trihydroxyindol (THI)-Methoden unterscheiden sich

1.) durch die Oxydation mit
   a) Mangandioxyd (18,58)
   b) Jod (70,81)
   c) Kaliumhexacyanoferrat (5,23,35,74,90,91,95)

2.) durch die Stabilisierung der Fluoreszenz
   a) mit Ascorbinsäure (5,18,58,74,81,91)
   b) mit BAL-Natriumsulfit oder anderen schwefelhaltigen Verbindungen (23,35,90,95)

3.) nach der Differenzierung von A und NA
   a) durch die Oxydation bei verschiedenem pH (58,70,95)
   b) durch Anregung mit verschiedenen Wellenlängen (5,18, 23,35,74,90,91)

4.) nach der Adsorption von A und NA
   a) an Aluminiumhydroxyd und Aluminiumoxyd (18,58,70,74, 81)
   b) an Kationenaustauscherharze (5,23,35,91)

5.) durch die Verstärkung der Fluoreszenz

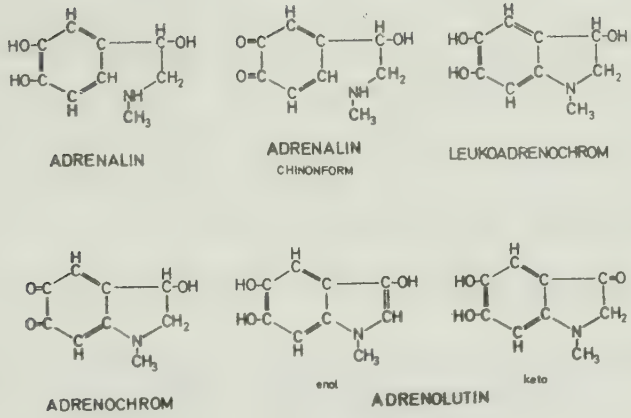

Abb. 2: Die Bildung von Adrenolutin aus Adrenalin

a) mit Zinksulfat (5,91)
b) mit Kupferionen (35,90,95)

Die Angaben über die zur Differenzierung von A ~~und NA~~ verwendeten Wellenlängenbereiche sind von Autor zu Autor verschieden. Sie sind in der Hauptsache abhängig von den optischen Eigenschaften der Meßinstrumente und von dem pH der Meßlösung. Z.B. absorbiert Ascorbinsäure UV-Licht, und man kann deshalb bei seiner Verwendung nur mit langwelligem Licht anregen.
Ein Maximum der Fluoreszenz wird erreicht, wenn man mit den Wellenlängen der Absorptionsmaxima anregt (18). Sie liegen für Adrenolutin bei 275, 325 und 408 nm und für Noradrenolutin bei 270, 325 und 396 nm. Die Fluoreszenzmaxima sind für Adrenolutin 520 bis 525 nm und für Noradrenolutin 510 bis 515 nm (18).
Nur A, NA, Isopropylnoradrenalin, das aber normalerweise nicht im Organismus vorkommt, und DOPA geben bei Anwendung der THI-Methode eine Fluoreszenz, nicht aber Dopamin (74).

Im Gegensatz dazu kondensieren alle Chinone mit Äthylendiamin zu stark fluoreszierenden Stoffen (96). S.B. fanden KILIAN et al. (26) im Rinderplasma 10 bis 30 ng 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure pro ml, die mit der HPLC-Methode als A und NA bestimmt wird.
Die mit biologischen Methoden und der HPLC-Methode gemessenen Werte stimmen besser überein als die mit der HPLC-Methode gemessenen (75). Die HPLC-Methode wird deshalb für die vorgesehenen Untersuchungen ausgewählt.

IV. Beschreibung der eigenen Methode

Wegen der hohen Empfindlichkeit der Methode sollen nur reinste Reagenzien und sauberste Geräte benutzt werden. Zum Ansetzen der Lösungen wird viermal destilliertes Wasser (Aqua quadridestillata) verwendet. Es empfiehlt sich, alle Geräte vor der Wiederbenutzung mit Chromschwefelsäure zu reinigen. Die Kunststoffgeräte werden nach einer Stunde, die Glasgeräte nach 24 Stunden aus der Säure genommen und gründlich mit Leitungswasser gewässert. Dieses wird mit Aqua dest. wieder abgespült. Dann werden die Glasgeräte bei hoher, die Kunststoffgeräte bei niederer Temperatur getrocknet. Die gesäuberten Geräte bewahrt man staubgeschützt auf.

1. Material und Reagenzien

1) Spektralfluorometer PMQ II (Fa. Zeiss) mit Netzstabilisator (Fa. Siemens). Im Anregungsteil befindet sich ein Prismenmonochromator, im Emissionsteil ein Gittermonochromator.
2) Eppendorfpipetten in verschiedenen Größen
3) Pasteurpipetten (Länge 215 mm, oberer Durchmesser 6 mm)
4) Eppendorfreaktionsgefäße 3810
5) Quarzküvetten MF 4
6) Kationenaustauscherharz AG 50W-X8, minus 400 mesh (Fa. Bio-Rad)

7) Perchlorsäure, 4n. 287,03 g einer 70%igen Perchlorsäure p.a. in 500 ml Lösung.
8) Phosphatpuffer, 0,1 molar (pH 6,5) + 0,1% EDTA. 14,196 g sek. Natriumphosphat p.a. und 1 g Titriplex II in 1 l Lösung werden mit 37%iger Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt.
9) Salzsäure, 1n (Fa. Merck)
10) Salzsäure, 2n. 197,08 g einer 37%igen Salzsäure werden mit Aqua quadridest. auf 1 l aufgefüllt.
11) Natronlauge, 2n + 1% EDTA. 250 g einer 32%igen Natronlauge und 10 g Titriplex II in 1 l.
12) Kaliumkarbonatlösung,5n. 86,38 g Kaliumkarbonat p.a. in 250 ml.
13) Kupferchloridlösung, 0,0025%ig (Gewicht/Volumen).
14) Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung, 0,25%ig.
Die Lösung ist jeden Tag frisch anzusetzen.
15) Natronlauge, 10n. 100 g Natriumhydroxydplätzchen p.a. in 250 ml Lösung.
16) Natriumsulfit-Lösung, 25%ig. 12,5 g Na_2SO_3 p.a. in 50 ml. Die Lösung ist 6 Tage haltbar.
17) BAL-Natriumsulfit-Lösung. 0,01 ml 2,3-Dimercaptopropanol-1 (BAL) zu 2 ml Natriumsulfitlösung. Die Lösung ist nur 1 1/2 Stunden haltbar.
18) Salzsäure, 0,005n. 5 ml der 1n Salzsäure in 1000ml Lösung.
19) Aufbewahrungsstandard
a. Adrenalin (MG 183,21) 0,1 mg Base/ml
18,192 mg l-Adrenalinhydrogentartrat [1] (MG 333,29)
mit 0,005n Salzsäure auf 100 ml auffüllen.
b. Noradrenalin (MG 169,18) 0,1 mg Base/ml
19,9137 mg l-Noradrenalinbitartrat [2] (MG 337,3)
mit 0,005n Salzsäure auf 100 ml auffüllen.
Bei + 4° C (Kühlschrank) ist der Standard etwa 4 Monate haltbar.
20) Arbeitsstandard
0,05 ml des Aufbewahrungsstandards mit 0,005n HCl auf 10 ml auffüllen. Das sind 0,0005 mg Katecholaminbase/ml.

1) Fa. Schuchardt, München
2) Fa. Serva, Heidelberg

2. Blutentnahme

Mit einer heparinisierten Kunststoffspritze werden aus einem Zentralvenenkatheter oder nach Punktion einer peripheren Vene oder Arterie etwa 2 bis 3 ml Blut entnommen. Das Blut wird sofort in eisgekühlten Kunststoffröhrchen 3 bis 4 Minuten bei 15 000 U/min (27 750 G) zentrifugiert. Etwa 1 ml Plasma wird abpipettiert und mit 4n Perchlorsäure (ein Zehntel des Plasmavolumens) enteiweißt, gekühlt und das gefällte Eiweiß erneut bei 15 000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und eingefroren.

3. Vorbereitung der Ionenaustauschersäulen

Das dünne Ende von Pasteurpipetten (Länge 215 mm, oberer Durchmesser 6 mm) wird auf zwei cm gekürzt, bis auf eine kleine Öffnung zugeschmolzen und der trichterförmige Ansatz der Pipette mit Glaswolle gestopft. Es ist darauf zu achten, daß man Säulen von gleichmäßiger Größe und Tropfgeschwindigkeit (1 ml pro 45 min) erhält, damit für die Bindung und Elution von A und NA die Kontaktzeit mit dem Harz bzw. mit der Säure in allen Säulen annähernd gleich ist. Die Säulen werden mit 50 mg Kationenaustauscherharz gefüllt und nacheinander mit 3 ml 2n NaOH, 3 ml Aqua quadridest., 3 ml 2n HCl, 3 ml Aqua quadridest. und 3 ml Phosphatpuffer (pH 6,5) durchgespült. Dabei setzt sich das Harz im engen Teil der Säule ab und wird in die Na^+-Form überführt. Mit 1 ml Aqua quadridest. wird der restliche Puffer herausgewaschen. Um die Durchflußgeschwindigkeit zu erhöhen, werden die Flüssigkeiten unter Druck durch die Säule gepresst. Dazu verwenden wir eine Rekordspritze mit Luer-Lock-Ansatz, die über einen Kunststoffschlauch mit der Säule verbunden ist.
Die Harzfüllung ist ca. 15 mm hoch und ca. 2 mm dick, und entspricht damit den Bedingungen für ideale Ionenaustauschersäulen (Durchmesser $\geq$ 50 Harzkörner, Verhältnis Höhe zu Durchmesser 4:1 bis 10:1).

4. Säulenpassage

Der eingefrorene Plasmaüberstand wird nach dem Auftauen mit 5n Kaliumkarbonatlösung auf pH 5,5 gebracht. Nachdem sich das entstehende Kaliumperchlorat (Löslichkeit: 7,5 g in 1 l Wasser) abgesetzt hat, gibt man den Plasmaextrakt auf die Säule. Dann schwemmt man das Perchlorat mit 1 bis 2 ml Aqua quadridest. auf, läßt wiederum absetzen und gibt den Überstand auf die Säule. Die Durchflußgeschwindigkeit wird durch leichten Druck bei ca. 1 ml pro 5 min gehalten.
A und NA werden auf Grund ihrer kationischen Eigenschaften an das Harz gebunden und gegen andere Kationen (Na^+) ausgetauscht.
Hat der Plasmaextrakt die Säule passiert, wäscht man sie mit 3 ml Phosphatpuffer (pH 6,5) um die Reste des Plasmaextraktes zu entfernen.

5. Elution

Bei einem pH unter 2,3 werden A und NA gegen H^+-Ionen ausgetauscht und damit eluiert. Zur Elution läßt man 3 ml 1n Salzsäure die Säule passieren, ohne die Durchflußgeschwindigkeit zu erhöhen. Die ersten 2 bis 3 Tropfen werden verworfen, da deren pH höher als 2,3 ist. Der folgende Milliliter des Eluates wird in einem geeichten Glaskolben aufgefangen. Mit ihm wird die Nachweisreaktion durchgeführt.

6. Nachweisreaktion

Man teilt das Eluat in zwei 0,5 ml Portionen, da mit jedem Meßwert ein Leerwert gemessen werden muß. Die Nachweisreaktion führt man in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch. Der Meßwert wird mit Kaliumkarbonatlösung vorsichtig, unter ständigem Rühren mit einer Glasmikroelektrode (zur Entfernung des entstehenden CO_2), auf pH 6,5 eingestellt. Zur pH-Kontrolle wird ein elektrisches pH-Meter benutzt.
Danach werden 0,05 ml Phosphatpuffer pH 6,5 und 0,02 ml

	Plasmaproben			HCl-Standard	
	MW	LW	faded blank	MW	LW
HCl, 1n	-	-	-	0,5	0,5
A	-	-	-	0,01(2)	
NA	-	-	-	0,01(2)	
Eluat	0,5	0,5	0,5	-	-
K_2CO_3, 5n	0,1	-	0,1	0,1	-
Puffer	0,05	0,05(1)	0,05	0,05	0,05(1)
$CuCl_2$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
I. K_3 $Fe(CN)_6$	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
II. Na_2SO_3-BAL 3 min nach I.	0,06	0,06(1)	-	0,06	0,06(1)
III. NaOH, 10n 10 sec nach II.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
IV. Na_2SO_3-BAL 10 min nach III.	-	-	0,06	-	-
V. K_2CO_3, 5n nach III.	-	0,1	-	-	0,1

(1) Puffer und Na_2SO_3-BAL werden vor dem Eluat zugegeben
(2) 0,01 ml A- oder 0,01 ml NA-Arbeitsstandard in 1 ml HCl, der für MW und LW halbiert wird.
MW = Meßwert, LW = Leerwert (nicht oxydierter)

Tabelle 1: Schema der Nachweisreaktion

Kupferchloridlösung und, als Oxydationsmittel, 0,03 ml der 0,25%igen Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung zugegeben. Nach 3 min wird mit 0,06 ml des BAL-Natriumsulfit-Gemisches die Oxydation gestoppt und nach weiteren 10 sec 0,1 ml 10n Natronlauge zugegeben.
Für den Leerwert werden 0,06 ml BAL-Natriumsulfit-Gemisch; 0,05 ml Phosphatpuffer; 0,5 ml Eluat; 0,02 ml Kupferchloridlösung; 0,03 ml 0,25%ige Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung; 0,1 ml 10n Natronlauge und 0,1 ml Kaliumkarbonatlösung in dieser Reihenfolge in das Reaktionsgefäß pipettiert. Da das

Reduktionsmittel (Natriumsulfit) vor dem Oxydationsmittel (Kaliumhexacyanoferrat) zugegeben wird, können A und NA nicht oxydiert werden und keine Lutine aus ihnen entstehen. Der Leerwert wird deshalb "nicht oxydierter" Leerwert genannt. Nach kurzem Zentrifugieren von etwa 1 min bei 10 000 U/min (12 350 G), das zur Entfernung der Staubpartikel aus dem Überstand dient, erfolgt die Messung.
Tabelle 1 zeigt die Mengen und Reihenfolge der Reagenzien für Meß- und Leerwert, sowie für die in Kapitel V. erwähnten Standards und Leerwerte.

7. Messung

Zur Messung dient ein Spektralfluorometer. Jeder Wert wird bei 395 und 335 nm Anregung und 510 nm Emission gemessen. Die Spaltbreiten von Anregungs- und Emissionsteil betragen 2 mm. Vor jeder Messung wird das Gerät mit einem Fluoreszenzstandard bei 395 nm Anregung und 510 nm Emission geeicht. Von den Proben werden Meß- und Leerwert bestimmt. Der Leerwert wird vom Meßwert abgezogen. Die Differenzen (D_1 und D_2) dienen zur Berechnung der A- und NA-Konzentrationen.

8. Berechnung

Die Eichwerte, zu denen D_1 und D_2 in Beziehung gesetzt werden, erhält man durch Messen einer bekannten Konzentration von A und NA in Plasma.
In zehn 1 ml Portionen Plasma gibt man 5 ng A oder 5 ng NA (= Standards). Man enteiweißt, zentrifugiert und behandelt sie wie die Plasmaproben. Meß- und Leerwert werden bei 395 und 335 nm Anregung und 510 nm Emission gemessen und die Differenzen zwischen beiden gebildet. Das Ergebnis ist die Summe des zugegebenen A bzw. NA und der noch im Plasma enthaltenen Katecholamine.
Mit den Plasmanullwerten (= Plasma ohne Zugabe von A und NA) wird die Fluoreszenz der noch im Plasma enthaltenen Ka-

techolamine bestimmt. Man erhält sie, indem man mehrere 1 ml-Portionen Plasma, die aus dem gleichen Pool wie die Standards stammen müssen, wie Plasmaproben behandelt. Der Mittelwert der Differenzen zwischen Meß- und Leerwert bei 395 und 335 nm Anregung und 510 nm Emission wird von den Mittelwerten der Differenzen zwischen Meß- und Leerwert der Plasmastandards abgezogen. Die so erhaltenen Ergebnisse sind die Eichwerte.
Für die Berechnung lassen sich zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten aufstellen:

$$\frac{x \cdot A_1}{5} + \frac{y \cdot NA_1}{5} = D_1 \qquad \frac{x \cdot A_2}{5} + \frac{y \cdot NA_2}{5} = D_2$$

Die Lösung der Gleichungen ergibt:

$$y = 5 \cdot \frac{A_2 \cdot D_1 - A_1 \cdot D_2}{A_2 \cdot NA_1 - A_1 \cdot NA_2}$$ ng pro Plasmavolumen

und

$$x = \frac{5 \cdot D_1 - y \cdot NA_1}{A_1}$$ **ng pro Plasmavolumen**

A_1 = Eichwert von 5 ng Adrenalin bei 395 nm Anregung und 510 nm Fluoreszenz
A_2 = Eichwert von 5 ng Adrenalin bei 335 nm Anregung und 510 nm Fluoreszenz
NA_1 = Eichwert von 5 ng Noradrenalin bei 395 nm Anregung und 510 nm Fluoreszenz
NA_2 = Eichwert von 5 ng Noradrenalin bei 335 nm Anregung und 510 nm Fluoreszenz
x = unbekannte Menge Adrenalin
y = unbekannte Menge Noradrenalin
D_1 = Differenz zwischen Meßwert und Leerwert bei 395 nm Anregung
D_2 = Differenz zwischen Meßwert und Leerwert bei 335 nm Anregung

Um die Katecholaminmenge in ng/ml zu erhalten, dividiert man durch das Plasmavolumen. Da die Standards und die Proben unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet werden, muß das Ergebnis nicht korrigiert werden.

9. Beispiel

Bei einem fünfjährigen Kind wurden während einer Operation im zentralvenösen Blut folgende Werte gemessen:

D_1 = 47,5 Skt. D_2 = 17 Skt.

Das Plasmavolumen war 2,1 ml.

Für A_1 = 24 Skt. NA_1 = 19 Skt.

A_2 = 16,5 Skt. NA_2 = 4,5 Skt. sind

$$y = 5 \cdot \frac{16,5 \cdot 47,5 - 24 \cdot 17}{16,5 \cdot 19 - 24 \cdot 4,5} = 9,1 \text{ ng NA pro Plasmavolumen}$$

$$x = \frac{5 \cdot 47,5 - 9,1 \cdot 19}{24} = 2,7 \text{ ng A pro Plasmavolumen.}$$

In diesem Beispiel beträgt der Katecholaminspiegel im Plasma 4,4 ng NA / ml und 1,3 ng A / ml.

V. Ergebnisse und Diskussion

Die Methode der A- und NA-Bestimmung von HÄGGENDAL (35) und BERTLER et al. (5) in der Modifikation von ENDEL und HOLLMAN (23) hat den Nachteil, daß die Intensität der Fluoreszenz zu Beginn der Messung nicht konstant bleibt, sondern in den ersten zehn Minuten stark abfällt. Deshalb kann das Meßergebnis erst nach dieser Zeit abgelesen werden. Dieser Fluoreszenzabfall hat außerdem einen erheblichen Verlust an Empfindlichkeit zur Folge. Durch Änderungen am Meßgerät und Modifikation der Methode wurde die Empfindlichkeit erhöht und die Fluoreszenz stabilisiert.

1. Steigerung der Empfindlichkeit

Die Spaltbreite des Prismenmonochromators im Anregungsteil vergrößerten wir von 1,4 mm auf 2,0 mm. Dadurch wird mit einer größeren Lichtmenge angeregt und die Intensität der Fluoreszenz steigt.

10 ng A ergeben bei einer Spaltbreite von 1,4 mm 7 Skt. und bei 2,0 mm 10 Skt. Zugleich ist das Frequenzband der Anregung etwas breiter: bei 395 nm statt 26 nm jetzt 30 nm.

Eine weitere erhebliche Steigerung der Emission wird erreicht durch Ersatz des Prismenmonochromators im Emissionsteil durch einen Gittermonochromator (M 20). Es wird ebenfalls eine Spaltbreite von 2,0 mm gewählt. Das entspricht einer Bandbreite von 10 nm bei 510 nm Emission.
10 ng A ergeben unter diesen Bedingungen bei 395 nm Anregung 30,6 $\pm$ 2,9 Skt. (n = 10).
Damit sind die Möglichkeiten der Empfindlichkeitssteigerung durch Veränderung des Meßgerätes erschöpft.

Entsprechend der Angaben von VENDSALU (91) und BERTLER et al. (5) versuchten wir durch Zugabe von Zn^{++} die Fluoreszenz zu steigern. Wir konnten damit keinen Effekt feststellen.
In weiteren Versuchen wurden Cu^{++} ($CuCl_2$) vor der Oxydation in die Reaktionslösung gegeben (35,90,95).
Damit läßt sich die Fluoreszenz von A und NA wesentlich steigern. Jetzt ergeben 5 ng A eine Fluoreszenz von 41,2 $\pm$ 1,6 Skt. (n = 10).

2. Die optimale Cu^{++} Konzentration

Um die optimale Cu^{++} Konzentration festzustellen, werden 5 ng A bzw. 5 ng NA vor der Oxydation mit steigenden Mengen einer 0,0025%igen Kupferchloridlösung versetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt. Der Verlauf der Kurve zeigt, daß 0,02 ml der Lösung eine optimale Wirkung haben. Diese Menge entspricht einer Konzentration von $5{,}8 \times 10^{-7}$ g/ml oder $3{,}4 \times 10^{-6}$ mol/l Meßlösung. In der Literatur werden unterschiedliche Werte angegeben: 3×10^{-4} mol/l (95), 1,7 bis $3{,}1 \times 10^{-7}$ g/ml (90), $4{,}17 \times 10^{-7}$ g/ml (35).
Wir fanden, daß die Cu^{++} nicht nur die Fluoreszenz steigern, sondern auch auf die Additivität und Stabilität der Fluoreszenz wirken.

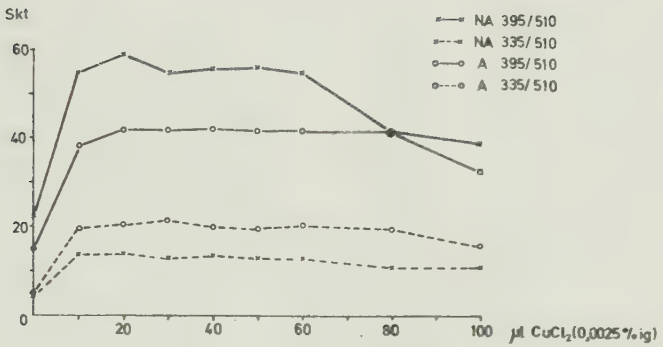

Abb. 3: Die optimale Cu^{++} Konzentration.
Bei verschiedenen Cu^{++} Konzentrationen wurde die Fluoreszenz gemessen. Sie steigt bis 20 µl steil an, fällt aber dann flach ab.

3. Die Wirkungen der Cu^{++}

In Abb. 4 wurde die Höhe der Fluoreszenz von 10 ng A und 10 ng NA mit und ohne Cu^{++} und die Höhe der Fluoreszenz eines Gemisches aus 10 ng A und 10 ng NA mit und ohne Cu^{++} aufgetragen. Die Abb. zeigt einmal, daß die Fluoreszenz mit Cu^{++} höher ist als ohne. Zum anderen ist die Fluoreszenz des Gemisches aus 10 ng A und 10 ng NA mit Cu^{++} die Summe der Fluoreszenz von 10 ng A und 10 ng NA. Wie in mehreren Versuchen nachgewiesen wurde, addieren sich bei der Messung des Gemisches aus 10 ng A und 10 ng NA ohne Zugabe von Cu^{++} die Fluoreszenzen des A und NA nicht, sondern man erhält einen Wert, der dem arithmetischen Mittel aus beiden Fluoreszenzen entspricht. Das Verhalten der Fluoreszenz von Gemischen mit verschieden großen Anteilen A und NA ohne Cu^{++} wurde nicht untersucht, da nur eine Methode mit Cu^{++} in Frage kommt.

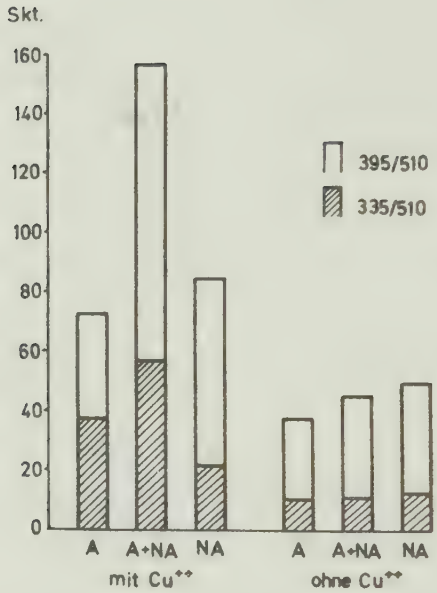

Abb. 4: Vergleich der Fluoreszenz mit und ohne Cu^{++}
A = 10 ng Adrenalin, NA = 10 ng Noradrenalin
A + NA = 10 ng Adrenalin + 10 ng Noradrenalin
Nur in dem Gemisch mit Cu^{++} addieren sich die Fluoreszenzen von A und NA.

In Abb. 5 und 6 zeigen wir die Höhe der Fluoreszenz von 5 ng A und 5 ng NA mit und ohne Cu^{++} vom Ende der Reaktion bis eine halbe Stunde danach. Ohne Cu^{++} fällt die Fluoreszenz in den ersten 10 Minuten auf 1/4 bis 1/5 des Ausgangswertes steil ab und bleibt danach konstant. Mit Cu^{++} zeigt A einen linearen Abfall von 2,5 Skt./10 min oder 5% des Ausgangswertes. NA fällt ebenfalls linear ab, aber nur mit einer Geschwindigkeit von 1 Skt./10 min oder 1,7%. Dieser Abfall wurde unter dauernder intensiver UV-Bestrahlung gemessen. Er ist sicher höher als bei normalen Messungen. Die Cu^{++} stabilisieren also die Fluoreszenz.

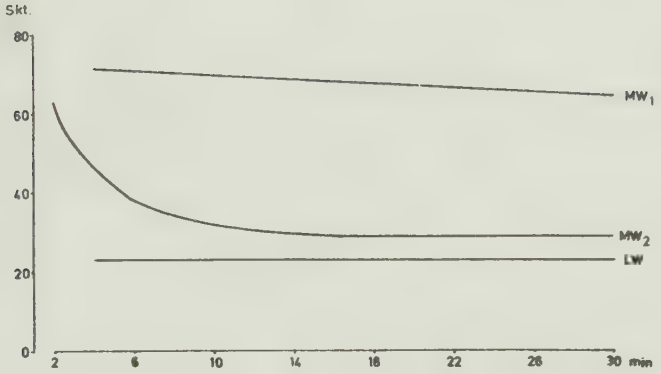

Abb. 5: Abfall der Fluoreszenz von 5 ng A
MW_1 = Meßwert mit Cu^{++} stabilisiert
MW_2 = Meßwert ohne Cu^{++}
LW = Leerwert. Er ist für MW_1 und MW_2 gleich.

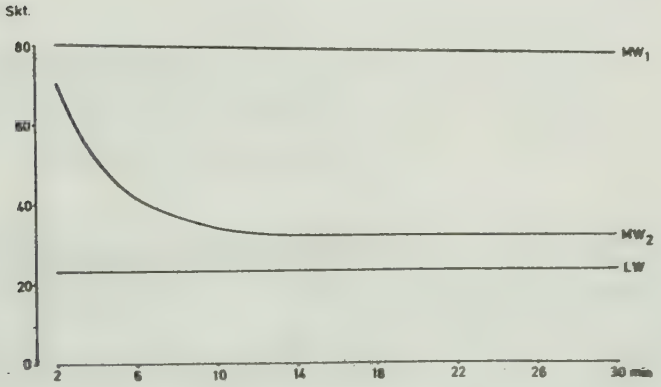

Abb. 6: Abfall der Fluoreszenz von 5 ng NA
Erklärung s. Abb. 5

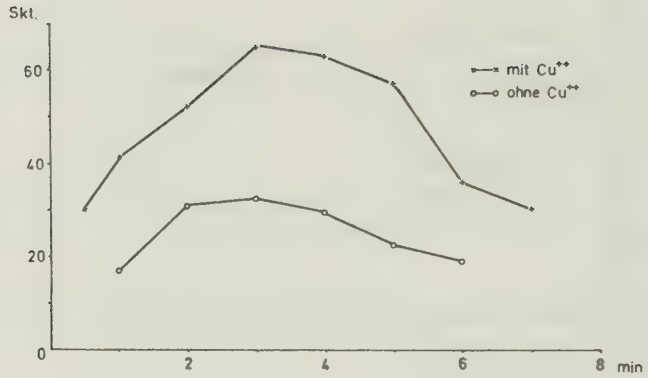

Abb. 7: Optimale Oxydationszeit
Aufgetragen ist die Emission von 5 ng NA bei 395 nm Anregung mit unterschiedlichen Oxydationszeiten. 3 min sind mit und ohne Cu^{++} optimal.

Läßt man A und NA verschieden lange oxydieren und führt dann die Nachweisreaktion wie üblich durch, so ergibt sich ein breites Maximum, wobei 3 Minuten ein Optimum darstellen (Abb. 7). Wird diese Zeit um einige Sekunden über- oder unterschritten, so bleibt der Fehler in der Schwankungsbreite. Mit oder ohne Cu^{++} erhält man das gleiche Ergebnis.

WEIL-MALHERBE et al. (95) fanden, daß die Cu^{++} nur einen Effekt zeigen, wenn sie vor der Oxydation zugegeben werden. Sie schlossen daraus, daß die Cu^{++} die Oxydation katalysieren.
VALORI et al. (90) wiesen auch einen Anstieg der Fluoreszenz durch Cu^{++} nach, wenn sie nach dem Reduktionsvorgang oder nach dem Alkalisieren, also nach der Oxydation, zugegeben werden. Die Wirkung war dann jedoch geringer. Diese Autoren vermuten trotzdem eine katalytische Wirkung der Cu^{++} bei der Oxydation.

Wir gaben die Cu^{++} nach dem Alkalisieren in die Lösung und erhielten auch die beschriebenen Wirkungen. Deshalb erscheint uns die Katalyse der Oxydation wenig wahrscheinlich. Denn einmal müßte man für die Oxydation der Katecholamine mit und ohne Cu^{++} andere Oxydationszeiten erwarten, da ein Katalysator zwar die Geschwindigkeit einer Gleichgewichtseinstellung beeinflußt, nicht aber die Art des Gleichgewichts. Zum anderen lassen sich Stabilisierung und Additivität der Fluoreszenz damit nicht genügend erklären. Die Oxydationszeit wird aber durch Cu^{++} nicht verändert.
Bemerkenswert ist, daß die Fluoreszenz kurz nach Ende der Reaktion mit oder ohne Stabilisierung durch Cu^{++} etwa gleich hoch ist, dann aber unterschiedlich schnell abfällt.
Man weiß z.B. vom Chinin, daß es an Glasflächen adsorbiert wird. BIRD (6) hat den Abfall der Chininkonzentration in 0,1 molarer Schwefelsäure vor und nach Stabilisierung gemessen. Der Verlauf seiner Kurven und der in Abb. 5 und 6 gezeigten ist annähernd gleich. Die Stabilisierung erreichte BIRD u.a. durch Sättigung der Glasoberflächen mit Chinin. Wir halten es für sehr wahrscheinlich, daß die Lutine an der Oberfläche der Quarzküvetten adsorbiert werden, und daß dieser Vorgang durch die Cu^{++} verhindert wird. So sind die identischen Oxydationszeiten mit und ohne Cu^{++}, der starke Abfall der Fluoreszenz ohne Cu^{++} und die Stabilisierung durch sie leicht zu erklären.

4. Errechnete Empfindlichkeit der Methode

Die Skala des Anzeigegerätes kann mit einer Genauigkeit bis zu 0,5 Skt. abgelesen werden. Theoretisch lassen sich in reinen Lösungen 0,04 ng NA pro ml HCl und 0,05 ng A pro ml HCl nachweisen. Bei Umrechnung der Empfindlichkeit auf Küvetten-Milliliter ist zu berücksichtigen, daß das Eluat (1,6 ml) für Meß- und Leerwert halbiert wird, und daß das Volumen zum Zeitpunkt der Messung nach Zugabe aller Reagenzien 0,86 ml beträgt. Man erhält dann eine errechnete Empfindlichkeit von 0,03 ng A oder 0,02 ng NA pro Küvetten-

Milliliter. Berücksichtigt man die Wiederfindungsrate der Methode (s.u.), so können in 1 ml Plasma 0,07 ng NA bzw. 0,08 ng A nachgewiesen werden.

5. Säulenpassage

Die Katecholamine sind nur in schwach saurer Lösung stabil und liegen darin als Kationen vor. Läßt man eine solche Lösung eine Kationenaustauschersäule passieren, dann werden die Katecholamine an das Harz gebunden. Beim nachfolgenden Eluieren mit Säure erhält man eine von anderen Substanzen weitgehend freie Katecholaminlösung. An das Kationenaustauscherharz stellen wir die Forderung, daß es die Katecholamine quantitativ bindet und sie in einem möglichst geringen Elutionsvolumen wieder freigibt. Außerdem soll es selbst oder seine Bestandteile weder die Nachweisreaktion noch die Fluoreszenz beeinflussen.
Bei Anwendung des faded blank ergab die Messung fallender Konzentrationen von A und NA, die eine Kationenaustauschersäule passiert hatten, von ungefähr 3 ng A bzw. NA/ml abwärts eine gleich hohe Differenz von Meß- und Leerwert. Selbst ein Katecholamin-freies Eluat gab ein falsch positives Ergebnis.
Um die Ursache für dieses Verhalten zu finden, änderten wir den Waschvorgang des Harzes, versuchten andere Harze und Leerwerte.
Ähnliche fehlerhafte Ergebnisse erhielten wir aber auch durch verunreinigte Reagenzien.

6. Waschen des Harzes

Die falsch positive Differenz zwischen Meßwert und faded blank in einem Katecholamin-freien Eluat ließ sich durch Waschen des Harzes mit 3 ml 2n NaOH - 3ml Wasser - 3 ml 2n HCl - 3 ml Wasser - 3 ml Puffer (pH 6,5) - 1 ml Wasser nicht vermeiden. Auch die Verwendung größerer Mengen der Lauge oder der Säure oder konzentrierter Säure half nicht weiter.

Ebenso wenig erfolgreich war das Waschen der Harze nach der Vorschrift HÄGGENDALs (34), das eigentlich nur notwendig ist, wenn keine hochgereinigten AG-Harze verwendet werden können und/oder aus einem Gemisch verschiedener Korngrößen bestimmte Fraktionen abgetrennt werden sollen (62).
Um einen Einfluß des Waschens auf die Methode nachzuweisen, haben wir A und NA, das an gewaschenem und ungewaschenem Harz adsorbiert war, gemessen und die Wiederfindung und Standardabweichung der beiden Gruppen verglichen. Da in keinem Fall das Ergebnis besser war, ist zu überlegen, ob man auf den Waschvorgang nicht verzichten kann. Dies würde eine erhebliche Zeitersparnis bedeuten.

7. Vergleich verschiedener Kationenaustauscherharze

Die Verwendung des nicht oxydierten Leerwertes zur Ausschaltung der falsch positiven Differenzen zwischen Meßwert und Leerwert ist nicht befriedigend, weil die Basisfluoreszenz und damit der Leerwert sehr hoch ist. Ideal wäre ein Harz, das nicht fluoresziert.
Nach der Grundsubstanz können wir die Kationenaustauscherharze in drei Gruppen einteilen: Phenolpolykondensate, polystyrolartige und polyacrylartige Harze. Die ersten beiden besitzen aromatische Struktur. Wir nehmen deshalb an, daß sie selbst oder ihre löslichen Bruchstücke, ebenso wie ihre Muttersubstanz, fluoreszieren. Sie wären dann im Rahmen von Fluoreszenzmethoden nur ausnahmsweise anwendbar.
Von polyacrylartigen Harzen erwarten wir keine Fluoreszenz, weil sie kettenförmig gebaut sind. Zur Vernetzung der Ketten dienen allerdings Stoffe, die eine aromatische Struktur haben. Sie sind aber nur in sehr geringer Menge vorhanden.
Wir testeten je ein typisches Harz aus diesen drei Gruppen unter den gleichen Bedingungen, wobei wir den faded blank (s.u.) anwendeten.
Die eingesetzte Testlösung enthält neben 10 ng A und 10 ng NA 0,9 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung und 0,1 ml Phosphatpuffer (pH 6,5). Wir gaben sie auf die Säulen, die jeweils

50 mg der verschiedenen Harze enthielten. Mit der abgetropften Testlösung machten wir die Nachweisreaktion. Wir behandelten sie als Meß- und Leerwert. Dann spülten wir die Säule mit 3 ml Aqua quadridest. und anschließend mit 3 ml Puffer. Wir fingen davon jeweils zwei 1 ml-Portionen auf und behandelten sie ebenfalls als Meß- und Leerwert. Zuletzt eluierten wir die Katecholamine mit 1n HCl, fingen drei 1 ml-Portionen auf und führten die Nachweisreaktion in Meß- und Leerwert durch. Berechnet wurden die A- und NA-Konzentrationen in den Waschlösungen bzw. im Eluat mit Standardwerten, die wir von 5 ng A bzw. 5 ng NA in 1 ml HCl erhalten haben.

In Abb. 8 zeigen wir das Testergebnis von Bio-Rex 40, 200 - 400 mesh +), einem Phenolpolykondensat. In jedem Milliliter der Spülflüssigkeiten, Wasser und Puffer, konnten wir eine Fluoreszenz nachweisen. Sie entsprach 0,5 bis 1 ng NA und einem negativen Wert für A. Im ersten Milliliter des salzsauren Eluates fanden wir 10 ng NA aber -2,3 ng A, was darauf hindeutet, daß fluoreszierende Bestandteile des Harzes das Meßergebnis verfälschen. In den weiteren Portionen HCl finden sich immer 2 bis 3 ng A und NA. Die Abspaltung von löslichen Bruchstücken im Sauren und deren Eigenschaft zu fluoreszieren machen das Harz für diese Methode untauglich.

Für die polyacrylartigen Harze testeten wir das schwach saure Harz Bio-Rex 70, 200 -400 mesh +), Abb. 9 zeigt, daß dieses die Katecholamine nicht fest genug zu binden vermag. Bereits mit Wasser und besonders mit Puffer (pH 6,5) werden die Katecholamine eluiert. Im ersten Milliliter Puffer erscheinen 5,5 ng NA und 4,4 ng A. Das ist ungefähr die Hälfte der eingesetzten Menge. Die Elution ist aber nach mehreren Millilitern Puffer oder Salzsäure noch nicht beendet. Bei annähernd vollständiger Elution übersteigt das Eluatvolumen das eingesetzte Volumen weit. Man erhält mit diesem Harz einen großen Verlust bzw. eine erhebliche Verdünnung

+) Fa. Bio-Rad

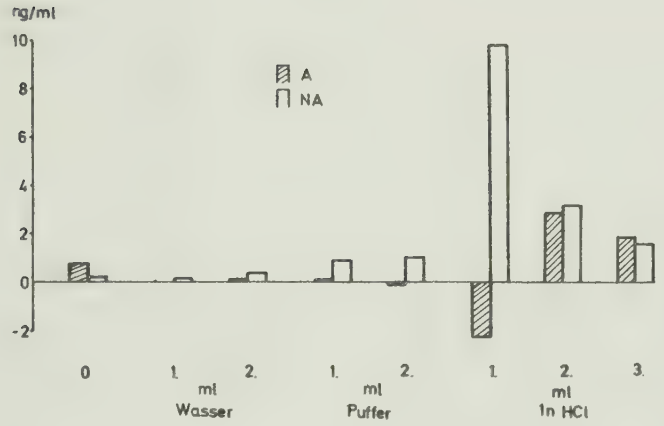

Abb. 8: Bio-Rex 40 und Katecholaminnachweis
Die Säulen sind die A- und NA-Konzentrationen in den Eluaten. 0 = abgetropfte Testlösung

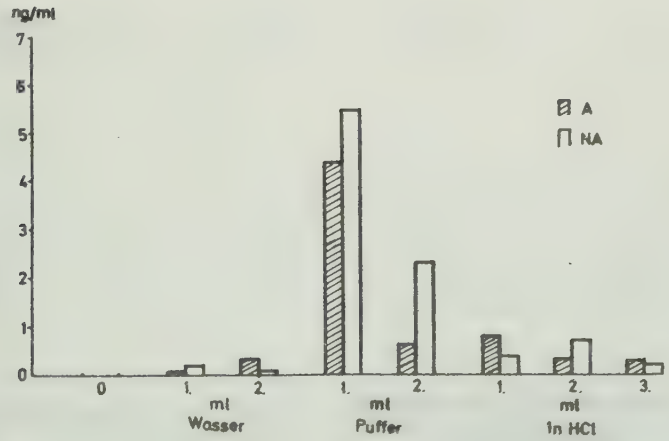

Abb. 9: Bio-Rex 70 und Katecholaminnachweis

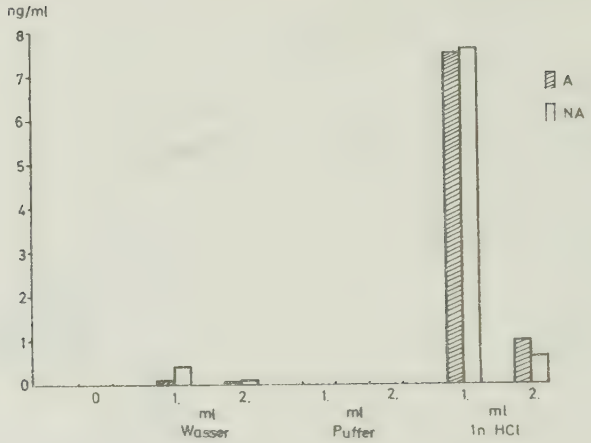

Abb. 10: AG 50 W - X8 und Katecholaminnachweis

der Katecholamine. Bei größeren Mengen des Harzes erschienen im Puffer weniger Katecholamine, aber wir erhielten ein noch weit größeres Eluatvolumen. Dieses Harz zeigt, wie erwartet, keine Eigenfluoreszenz.

Als drittes Harz testeten wir AG 50 W - X8, minus 400 mesh +) (Abb. 10). Es hat ein Polystyrolgrundgerüst. Unter den Testbedingungen erschien nur im Wasser eine geringe Menge von etwa 0,1 bis 0,4 ng A bzw. NA. Der erste Milliliter des salzsauren Eluates enthält 7,5 ng A und 7,6 ng NA, also 3/4 der eingesetzten Katecholamine. Im zweiten Milliliter erscheinen noch 1 ng A und 0,6 ng NA. Dieses wird bei der Nachweismethode noch miterfaßt, da bei der beschriebenen Testung die ersten 2 bis 3 Tropfen des Eluates nicht verworfen wurden.

Um die einzelnen Harze auf die Abgabe fluoreszierender Spaltprodukte zu prüfen, wurden die gefüllten Säulen mit Aqua quadridest., Puffer (pH 6,5) und 1n HCl geprüft. Die abgetropften Flüssigkeiten wurden als Meß- und Leerwert behandelt.

+) Fa. Bio-Rad

Die Lösungen, die die Bio-Rex 70 gefüllte Säule passierten, zeigten keine Differenz zwischen Meß- und Leerwert. Dieses Harz gibt unter diesen Bedingungen keine fluoreszierenden Spaltprodukte ab.
Bei AG 50 W - X8 scheinen Wasser und schwach saure Lösungen (Puffer pH 6,5) keine fluoreszierenden Stoffe abspalten zu können. Es ergab sich keine Differenz zwischen Meß- und Leerwert. Nur bei 1n HCl ergab sich eine solche Differenz.
Mit Bio-Rex 40 hatten wir die schlechtesten Resultate. Schon Wasser und Puffer zeigten einen Unterschied zwischen Meß- und Leerwert. Bei der 1n HCl war der Leerwert sogar höher als der Meßwert.
Das Harz AG 50 W - X8 ist nach diesen Untersuchungen für unsere Methode am günstigsten. Der Fehler durch die Eigenfluoreszenz kann durch Verwendung des nicht oxydierten Leerwertes ausgeschaltet werden.

8. Harzmenge und Elutionsvolumen

Die Austauschersäulen müssen mit einer Harzmenge gefüllt werden, die über eine genügend große Adsorptionskapazität verfügt. Auch größere Mengen A und NA, wie sie bei pathologischen Zuständen auftreten, müssen vollständig adsorbiert und bei der Elution in einer möglichst kleinen Fraktion wieder abgegeben werden.
Um diese optimale Harzmenge festzustellen, ist das von ENDEL und HOLLMANN (23) angegebene Verfahren am einfachsten und sichersten. Eine Testlösung aus 0,1 ml Puffer (pH 6,5), 10 ng A, 10 ng NA und 0,9 ml Wasser wird auf Austauschersäulen gegeben, die steigende Mengen Harz enthalten, z.B. 40, 50, 60, 70 mg usw. Ist die Kapazität der Säulen ausreichend, dann sind in der abgetropften Lösung keine Katecholamine nachweisbar. Bei ausreichender Kapazität wird mit 1n HCl eluiert und in 0,4 ml-Portionen aufgefangen. Mit dem Eluat wird die Nachweisreaktion (nur der Leerwert) durchgeführt und bei 395 nm Anregung und 510 nm Emission gemessen. Als optimale Füllung der Säulen ergab sich bei mehreren Testreihen 50 mg Harz.

Bei dem angegebenen Verfahren erhält man gleichzeitig das Elutionsvolumen. Die vierte der 0,4 ml-Portionen des Eluates enthält keine Katecholamine mehr, man braucht also nur die ersten drei Portionen, das sind 1,2 ml, auffangen. Die pH-Kontrolle zeigte, daß die ersten drei Tropfen des Eluates einen pH > 2,3 haben. Wir verwerfen sie deshalb und fangen nur 1 ml Eluat auf.

9. Leerwerte

Für die THI-Methode werden eine Reihe von Möglichkeiten der Leerwertbestimmung angegeben. Von diesen sind nur der nicht oxydierte Leerwert und der faded blank erwähnenswert.
Beim nicht oxydierten Leerwert wird das Reduktionsmittel vor dem Oxydationsmittel zugegeben. Es kommt nicht zur Oxydation der Katecholamine, folglich können auch keine Lutine gebildet werden.
Beim faded blank werden die Katecholamine zuerst wie bei der Aufarbeitung des Meßwertes oxydiert. Statt die Oxydation mit dem Reduktionsmittel zu stoppen, wird aber nach drei Minuten Natronlauge zugegeben. Die Oxydation läuft jetzt 10 min im Alkalischen weiter bis aus den Katecholaminen nicht mehr fluoreszierende Verbindungen entstehen.
In die Salzsäure treten bei der Säulenpassage Bestandteile des Harzes über. Im faded blank werden sie durch die Oxydation im Alkalischen zerstört, während sie im Meßwert erhalten bleiben (34). Da diese Bestandteile fluoreszieren, erklärt das die falsch positive Differenz in Katecholamin-freien Eluaten bei Anwendung des faded blank. Beim nicht oxydierten Leerwert ist das nicht der Fall, deshalb verwenden wir ihn für die Methode.
Der nicht oxydierte Leerwert und der faded blank sind aus den erwähnten Gründen unterschiedlich hoch. Beispielsweise war der Mittelwert des faded blank nach Säulenpassage in Katecholamin-freien und -haltigen Eluaten 14,9 $\pm$ 2,2 Skt. (n = 21). Der Mittelwert der nicht oxydierten Leerwerte lag bei 31,0 $\pm$ 3,2 Skt. (n = 29). Es erscheint auch möglich,

daß bei der Anwendung des faded blank zu hohe Wiederfindungen gemessen werden können.
Im faded blank dauert die Zerstörung der Katecholamine 10 min. Der nicht oxydierte Leerwert kann nach Zugabe aller Reagenzien gleich gemessen werden. Das bedeutet eine nicht unerhebliche Zeitersparnis bei Verwendung des nicht oxydierten Leerwertes.

10. Leerwertfehler beim nicht oxydierten Leerwert

Im nicht oxydierten Leerwert werden die Katecholamine nicht in Lutine umgewandelt, d.h. sie bleiben unverändert. A und NA besitzen eine geringe Eigenfluoreszenz, die den Leerwert verfälschen kann. Um festzustellen, ob bei kleinen Katecholamin-Konzentrationen ein Leerwertfehler besteht, haben wir die Leerwerte von sieben Plasmaproben mit den Leerwerten von dreizehn Proben, die 5 ng NA und neun Proben, die 5 ng A enthalten, verglichen. Der Unterschied war einmal nicht signifikant, zum anderen lag der Mittelwert der Leerwerte ohne Katecholamine höher als der Mittelwert der Leerwerte mit Katecholaminen.
Bei einer Meßreihe mit steigenden A-Konzentrationen stellten wir bei Konzentrationen über 200 ng A/ml einen Anstieg der Leerwertfluoreszenz fest. Bei Messung von 1000 ng A/ml beträgt der Fehler wegen des überhöhten Leerwertes 0,5%. Dieser Fehler ist zu vernachlässigen.

11. Wiederfindung

Zur Berechnung der Wiederfindung setzen wir die Meßwerte von je 5 ng A und 5 ng NA in jeweils 1 ml HCl gleich 100% und vergleichen sie mit den Meßwerten von je 5 ng A bzw. NA in jeweils 1 ml Plasma. Für A ergibt sich eine Wiederfindung von 58,8 $\pm$ 16,4 % (n = 9) und für NA eine solche von 56,4 $\pm$ 11,6 % (n = 12).

HÄGGENDAL (35) gibt zwei Werte für die Wiederfindung an. Mit

50 ng A und 50 ng NA in 10 ml Plasma fand er 71 ± 16 %, mit 10 ng A und 10 ng NA in 10 ml Plasma 73 ± 29 %. Er hat diese Werte unter den gleichen Bedingungen wie wir bestimmt. Der Grund für den zahlenmäßigen Unterschied liegt an dem Arbeiten mit unterschiedlichen Volumina.
VENDSALU (91) ermittelte die 80,2 ± 13,1 % Wiederfindung seiner Methode in ähnlicher Weise wie wir. Er schwemmte den Perchloratniederschlag nach dem Neutralisieren mit Wasser auf und gab den Überstand zu dem Plasmaextrakt. Darin unterscheiden sich unsere und seine Wiederfindung.
O'HANLON et al. (70) geben den A- und NA-Standard nach dem Enteiweißen in den Plasmaextrakt und messen dann die Wiederfindung, für die sie 91,8 ± 3,02 % angeben. Uns erscheint dieses Vorgehen nicht richtig, denn das Enteiweißen, bei dem nach unseren Untersuchungen der größte Verlust auftritt, wird dabei nicht berücksichtigt.

12. Verluste durch das Enteiweißen des Plasmas

Nach dem Enteiweißen, Zentrifugieren und Dekantieren können wir aus 1 ml Plasma plus 0,1 ml 4n Perchlorsäure im Mittel nur 0,75 ± 0,01 ml Plasmaüberstand gewinnen (n = 14). Da die Katecholamine nur in der flüssigen Phase verteilt sind (5), und da in 1 ml Plasma nur 0,945 ml Wasser enthalten sind, bedeutet das bei der Plasmaaufarbeitung einen Verlust von 28% der Katecholamine bzw. eine Wiederfindung von 72 ± 1% (n = 14).
Der Nachweis dieses hohen Verlustes beim Enteiweißen wurde auch auf andere Weise geführt. Wir schwemmten das gefällte Protein mit 1 ml 0,4n Perchlorsäure auf, zentrifugierten es und gaben den Überstand zum Plasmaextrakt. Die Messung ergibt dann eine Wiederfindung von 75,3 ± 9,3 % (n = 6). Nach einmaligem Waschen des Proteinniederschlages lassen sich ca. 18% mehr Katecholamine nachweisen.
Dieses Vorgehen ist aber während des normalen Arbeitsganges nicht möglich, weil das Aufschwemmen sehr zeitraubend ist,

nicht immer vollständig gelingt, und deshalb ungenaue Ergebnisse liefert.
Der Verlust von 28% setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die wir nicht im einzelnen bestimmt haben, aber wegen des besseren Verständnisses anführen wollen.
Ein Teil des Plasmawassers bleibt im gefällten Protein eingeschlossen. Dieser Anteil ist abhängig vom Proteingehalt des Plasmas, der Tourenzahl der Zentrifuge, der Dauer des Zentrifugierens und der Zeit, die zwischen Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes vergeht. Das Plasma enthält 6,72 ± 0,35 g Protein pro 100 ml Plasma; das sind 5,1% Abweichung vom Mittelwert. Die anderen Faktoren sind durch gleichmäßige Behandlung aller Plasmaproben konstant zu halten.
Ein weiterer Verlust tritt durch Benetzung der Gefäßwand (besonders Glasgefäße) ein. Diese Menge ist, unabhängig vom Plasmavolumen, bei gleichen Gefäßen gleich groß. Bei kleinen Volumina fällt dieser Betrag prozentual stärker ins Gewicht als bei großen. Außerdem ist ein Verlust durch Adsorption der Katecholamine an die Oberfläche der Erythrocyten oder der gefällten Proteine nicht auszuschließen.
Diese Verluste können in der Formel zur Berechnung unberücksichtigt bleiben, wenn Standards und Proben unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet und gemessen werden.

13. Verluste durch das Neutralisieren

Bei der Neutralisation des Plasmaüberstandes entsteht Kaliumperchlorat, d.h. ein fester Niederschlag. Es gelten die gleichen Überlegungen wie für das Enteiweißen. Nach dem Absetzen des Kaliumperchlorates und dem Abpipettieren des Überstandes schwemmten wir das Perchlorat mit Aqua quadridest. auf, ließen wieder absetzen und gaben den Überstand auch auf die Säule.
Bei sechs Proben mit 5 ng A und acht Proben mit 5 ng NA, die wir so behandelten, erhielten wir eine Wiederfindung von 63,2 ± 17,9 % (n = 14). Die Wiederfindung läßt sich also dadurch um ca. 6% erhöhen. Da die Durchführung einfach und

wenig zeitraubend ist, wurde dieses Vorgehen in dem Arbeitsgang angewendet.

14. Meßgenauigkeit

Bei acht Messungen von 5 ng NA in 1 ml 1n HCl erhielten wir bei 395 nm Anregung und 510 nm Emission einen Meßwert von 52,0 ± 3,3 Skt., das sind ± 6,35% Abweichung. Bei 335 nm Anregung und 510 nm Emission erhielten wir 15,9 ± 1,2 Skt., das sind ± 7,55% Abweichung vom Mittelwert. Zehn Messungen von 5 ng A in 1 ml 1n HCl ergaben bei 395 nm/510 nm 41,2 ± 1,6 Skt. oder ± 3,9% und für 335 nm/510 nm 21,1 ± 0,8 Skt. oder ± 3,8% Abweichung vom Mittelwert.

15. Reproduzierbarkeit

5 ng A bzw. 5 ng NA haben wir in 1 ml 1n HCl gegeben und Meß- und Leerwert bei 395 nm und 335 nm Anregung gemessen. Mit Eichwerten, die wir in einer anderen Meßreihe von 5 ng A und 5 ng NA bestimmten, rechneten wir die A- und NA-Konzentrationen aus.
Für 5 ng A berechneten wir 4,99 ± 0,36 ng A, das sind 99,89 ± 7,14 % (n = 12) und für 5 ng NA 5,01 ± 0,42 ng NA, das sind 100,22 ± 8,33 % (n = 10).

16. Linearität

Eine Voraussetzung für die Berechnung der A- und NA-Konzentrationen aus der Fluoreszenz nach der angegebenen Formel ist, daß die Fluoreszenz mit der Konzentration linear steigt. In den Abb. 11, 12 und 13 ist die Fluoreszenz von A und NA gegen die Konzentration aufgetragen. Sowohl in dem Bereich von 0 bis 1 ng/ml, als auch in hohen Bereichen ist die Beziehung streng linear.

17. Spezifität

Die Fluoreszenzcharakteristika der mit und ohne Cu^{++} gebil-

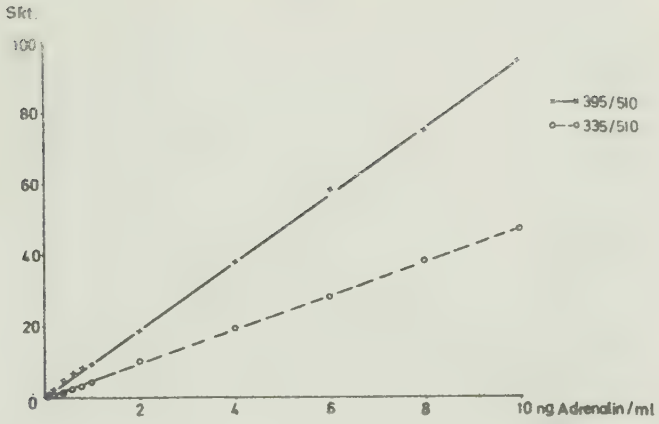

Abb. 11 : Linearität des Adrenalinnachweises
Abszisse: Konzentration von A; Ordinate: Fluoreszenz in Skalenteilen. Auch in den untersten Bereichen ist das Verhalten linear.

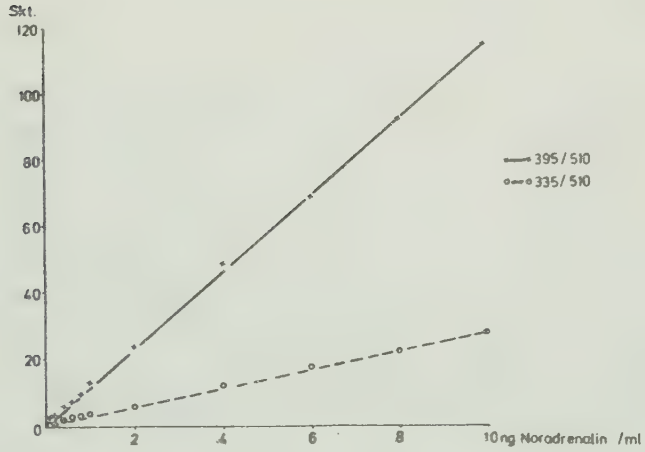

Abb. 12 : Linearität des Noradrenalinnachweises
Abszisse: NA-Konzentration; Ordinate: Fluoreszenz. Das Verhalten ist im gesamten Bereich linear.

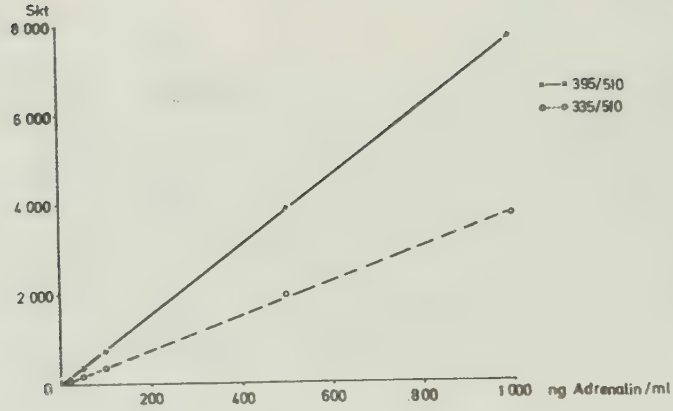

Abb. 13: Linearität beim Nachweis hoher Konzentrationen von Adrenalin. In den höchsten Konzentrationen steigt die Fluoreszenz noch linear.

deten Fluorophore sind identisch (Abb. 14 und 15). Damit sind auch die Fluorophore die gleichen, nämlich Lutine. Wir können daraus schließen, daß die Cu^{++} nicht die Art der gebildeten Fluorophore beeinflussen. Es gibt genaue Untersuchungen über die Spezifität des A- und NA-Nachweises mit der THI-Methode (19,74). Danach geben nur A, NA, Isopropylnoradrenalin und Dopa mit der THI-Methode ein fluoreszierendes Produkt. Isopropylnoradrenalin ist kein physiologisches Katecholamin, und Dopa wird von dem Kationenaustauscherharz AG 50W-X8 in der Na^{+}-Form nicht festgehalten (5). Dopamin gibt mit der THI-Methode keine Fluoreszenz. Die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Katecholamine ist in Tabelle 2 dargestellt. Die in der Meßlösung nachgewiesene Fluoreszenz kann also nur von den Reaktionsprodukten des A und NA stammen.

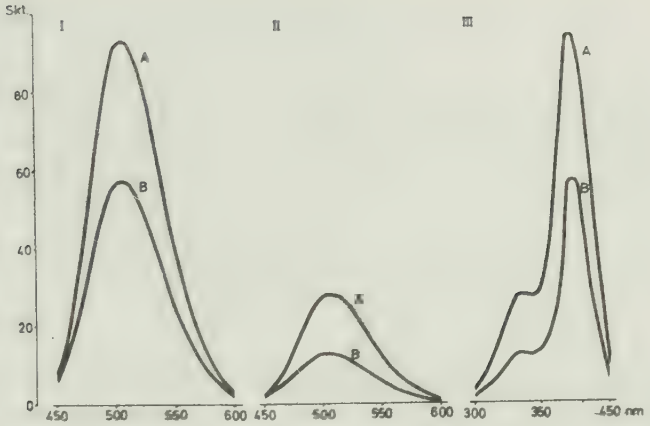

Abb. 14: Fluoreszenzcharakteristika von Noradrenalin.
A = mit Cu^{++}; B = ohne Cu^{++}. I = 395 nm Anregung,
II = 335 nm Anregung, III = 510 nm Fluoreszenz.
Die Maxima liegen bei den gleichen Wellenlängen.

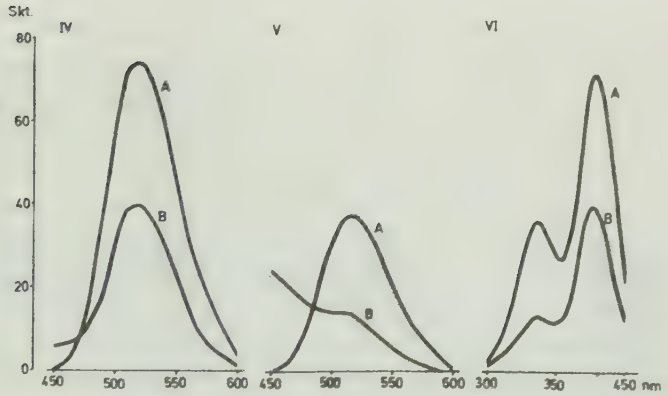

Abb. 15: Fluoreszenzcharakteristika von Adrenalin.
A = mit Cu^{++}; B = ohne Cu^{++}. IV = 395 nm Anregung,
V = 335 nm Anregung, VI = 510 nm Fluoreszenz.
Die Maxima liegen bei den gleichen Wellenlängen.

	Skalenteile Fluoreszenz bei 395 nm/510 nm	335 nm/510 nm
Adrenalin	960	480
Noradrenalin	1160	280
Dopa	135	80
Dopamin	0	0

Tabelle 2: Fluoreszenz verschiedener Katecholamine (Konzentration 100 ng/ml)

Das Verhältnis der Intensität der Fluoreszenz bei 395 nm zu der bei 335 nm ist für A und NA verschieden. Unter den beschriebenen Bedingungen war es für A 2 : 1 und für NA 4 : 1. Durch die Anregung bei diesen beiden Wellenlängen ist eine einfache Möglichkeit zur Differenzierung gegeben.

18. Standard zur Berechnung

Wir halten die Berechnung der A- und NA-Konzentrationen mit Standardwerten, die durch Zugabe der Katecholamine in das enteiweißte Plasma oder in das Eluat nach der Säulenpassage oder sogar in reinen Lösungen gewonnen wurden, für fehlerhaft. Einmal werden die Verluste, die bei der Aufarbeitung entstehen, nicht miterfaßt. Man muß sie dann mit Korrekturfaktoren in Rechnung setzen. Zum anderen wird in reinen Lösungen die Eigenfluoreszenz des Harzes nicht berücksichtigt. Die Harzbestandteile verursachen aber, wahrscheinlich durch Absorption oder Fluoreszenzhemmung, besonders im kurzwelligen UV-Bereich, eine Verschiebung der Relation Fluoreszenz bei 395 nm zu Fluoreszenz bei 335 nm. Nach der Säulenpassage ergibt sich für A das Verhältnis 1,98 : 1 (395 : 335) und für NA das Verhältnis 4,46 : 1. Diese Fluoreszenzverschie-

bung führt bei der Berechnung zu fehlerhaften Ergebnissen.
Eine genaue Berechnung der Meßwerte ist nur möglich, wenn die Standards den gleichen Bedingungen unterworfen werden wie die Plasmaproben. Das ist bei der angegebenen Methode der Fall.

VI. Klinische Untersuchungen

1. Methodik

Bei zwei verschiedenen Altersgruppen von Kindern (9 Säuglingen im Alter von 2 bis 12 Monaten und 10 Kindern im Alter von 13 Monaten bis 11 Jahren), bei denen große chirurgische Eingriffe durchgeführt werden müssen, wird unter weitgehend standardisierten Bedingungen vor, während und nach der Operation der Plasma-Katecholaminspiegel bestimmt. In Tabelle 3 und 4 sind Alter, Geschlecht, Erkrankung, Art des operativen Eingriffes und Operationsdauer zusammengestellt.

12 bis 24 Stunden vor dem operativen Eingriff wird in Lokalanästhesie ein Polyäthylenkatheter in die Vena cava inferior eingeführt, wobei die Katheterspitze oberhalb des Zwerchfells zu liegen kommt. Dadurch wird es möglich, ohne Irritation des Kranken zu definierten Zeiten zentralvenöses Blut zu entnehmen. Die Blutentnahmen erfolgen unmittelbar vor Einleitung der Narkose, in Narkose unmittelbar vor Operationsbeginn, unter der Operation 15 und 60 min nach Operationsbeginn, sowie 5 min vor Operationsende, dann 30 und 90 min nach Operationsende, sowie am Abend des Operationstages. Am ersten Tag nach der Operation werden um 9.00, 13.00 und 19.00 Uhr Blutproben entnommen.
Die Aufarbeitung des Blutes und die Messung der Katecholamine erfolgt wie im methodischen Teil beschrieben.

Alter	Geschlecht	Diagnose	Operation	Operationsdauer
2 Mon	m	Gallengangsatresie, Situs inversus	Laparotomie	80 min
4 Mon	m	Analatresie, Anus praeter	Anus praeter Rückverlagerung mit Rectosigmoidektomie, Abdomino-perinealer Durchzug	145 min
4 Mon	m	Invagination	Desinvagination, Appendektomie	62 min
5 Mon	m	Anal- und Rectumatresie, Recto-vesicale Fistel, Anus praeter	Abdomino-perinealer Durchzug, Mitnahme des Anus praeter	195 min
8 Mon	m	Invagination	Dünndarmresektion	85 min
8 Mon	m	Relaxatio diaphragmatica	Zwerchfellraffung	65 min
8 Mon	w	Megacolon, Anus praeter	Anus praeter-Rückverlagerung nach Hemicolektomie	155 min
10 Mon	m	Thoraxwanddefekt	Rippenplastik	185 min
12 Mon	m	Hiatushernie	Retroösophageale Hiatusplastik, Gastropexie	60 min

Tabelle 3 : Säuglinge, m = männlich, w = weiblich

Alter	Geschlecht	Diagnose	Operation	Operationsdauer
13 Mon	m	Steißbeinteratom	Teratomexstirpation	140 min
1 9/12 J	w	Portale Hypertension	Varizenumstechung, Splenektomie	105 min
4 3/12 J	w	Ileus nach Appendektomie	Lösung der Adhäsionen	43 min
4 9/12 J	m	sekundäres Megacolon; kongenitaler Zwerchfell-defekt	Sphinktermyotomie, Defektverschluß	150 min
5 J	m	Morbus Werlhof	Splenektomie	70 min
5 3/12 J	w	Paralytischer Ileus	Laparotomie	52 min
7 9/12 J	w	Hämangiopericytom der rechten Beckenschaufel	Beckenschaufel- und Hüft-gelenksresektion	192 min
9 3/12 J	w	Varizenblutung bei Lebercirrhose	Varizenumstechung	255 min
11 J	m	Wilmstumor der rechten Niere	Nephrektomie, Cavateilresektion	195 min
11 J	m	Tumor der linken Nebenniere	Adrenalektomie links, Nephrektomie links	230 min

Tabelle 4 : Kinder im Alter von 13 Monaten bis 11 Jahren
m = männlich, w = weiblich

Säuglinge

			Operation			nach Operation			1. Tag nach Op.		
	A	B	Op.	Op.	Op.E	60'	90'	a	f	Mi	a
1.	6,2	5,2	6,3	-	11,9	13,6	14,9	0	1,0	4,1	0
2.	6,5	5,2	12,8	2,6	-	9,7	2,7	5,9	4,8	5,6	4,3
3.	4,8	3,9	5,0	-	7,3	4,0	5,5	-	6,1	4,3	3,9
4.	0	0	3,3	2,0	2,0	3,4	1,7	-	0,5	1,8	0
5.	0,1	0	0	-	0	0	1,5	0,7	0	-	4,5
6.	1,1	0	16,0	-	17,6	0,7	1,2	1,4	0	0,8	-
7.	6,3	1,3	3,3	15,7	6,6	1,8	3,4	1,1	1,1	3,8	0
8.	0	4,0	0	2,6	5,9	2,9	2,9	4,6	1,2	2,9	7,6
9.	1,8	1,5	14,3	-	2,0	0,2	0,9	2,5	1,4	0,6	0,2
m	3,0	2,3	6,8	5,7	6,7	4,0	3,8	2,3	1,9	2,7	2,5
± s	2,9	2,2	6,1	6,6	5,8	4,7	4,4	2,2	2,1	1,7	2,9

Kinder

1.	1,7	2,8	1,2	1,7	2,5	1,7	2,7	0,4	0	1,0	2,0
2.	0,6	1,0	1,6	3,1	1,7	0,6	1,4	1,5	2,0	2,5	0,9
3.	-	1,5	1,6	3,7	1,5	1,9	1,5	-	1,0	1,2	2,6
4.	1,7	3,4	1,0	0,9	3,2	5,1	3,3	1,3	0,8	4,1	1,5
5.	1,1	1,6	1,6	-	1,7	1,1	2,5	1,0	-	1,3	1,3
6.	5,5	7,6	4,4	-	8,6	5,0	-	-	2,1	6,1	4,9
7.	0,9	1,1	2,4	0,2	2,5	1,6	1,3	1,0	1,5	-	1,1
8.	-	2,2	1,4	1,2	3,3	0,7	0,8	1,5	2,1	1,5	1,1
9.	3,9	0,7	1,0	2,3	2,0	0,9	2,6	3,2	3,2	2,1	2,5
10.	0,2	2,3	0	1,8	1,1	1,6	0,4	1,4	2,0	0,9	1,7
m	1,9	2,4	1,7	1,9	2,8	2,0	1,8	1,4	1,6	2,6	2,0
± s	0,6	2,0	1,1	1,2	2,2	1,7	1,0	0,8	0,9	2,1	1,2

Tabelle 5: Adrenalinplasmaspiegel bei Säuglingen und Kindern in den einzelnen Operationsphasen. A = Ruhewert, B = Narkosewert, m = Mittelwert, s = Standardabweichung. f = früh, mi = mittags, a = abends.

Säuglinge

	Operation					nach Operation			1. Tag nach Op.		
	A	B	Op.	Op.	Op.E	30'	[illegible]	a	f	mi	a
1.	[illegible]	[illegible]	1,5	–	18,0	[illegible]	0,1	7,4	3,6	7,7	[illegible]
2.	0,1	[illegible]	11,2	3,6	–	4,4	1,1	11,8	2,0	1,7	[illegible]
3.	1,9	[illegible]	[illegible]	–	2,6	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]
4.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]
5.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]
6.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–
7.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
8.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
9.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
m	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
± s	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Kinder

1.	0,8	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	6,4	4,2	4,0	4,6	[illegible]
2.	1,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,	2,7	1,7	[illegible]	[illegible]	[illegible]
3.	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]
4.	1,3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	6,2	1,1	1,5	6,0	5,0
5.	0,7	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	1,6	0,8	–	1,1	1,0
6.	4,4	[illegible]	[illegible]	–	[illegible]	[illegible]	–	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]
7.	3,8	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,	4,3	4,3	3,7	–	1,4
8.	–	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,9	1,8	[illegible]	[illegible]	[illegible]
9.	0,7	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,8	1,4	1,4	[illegible]	[illegible]
10.	4,1	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	2,9	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
m	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
± s	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	2,2	1,7	1,4	[illegible]	[illegible]

Tabelle 6: Noradrenalinplasmaspiegel bei Säuglingen und Kindern in den einzelnen Operationsphasen. m = Mittelwert, s = Standardabweichung. f = früh, mi = mittags, a = abends.

2. Ergebnisse

Bei den Säuglingen steigt der Plasmaadrenalinspiegel von 3,0 ng/ml am Morgen des Operationstages auf 6,8 ng/ml am Anfang der Operation. Er bleibt bis zum Ende der Operation in dieser Höhe. Danach fällt er auf 4,0 ng/ml ab und liegt am Abend des Operationstages mit 2,3 ng/ml bereits im Bereich des Ausgangswertes. Das gilt auch für die Werte am ersten postoperativen Tag. Der Anstieg während und der Abfall nach der Operation ist statistisch nicht signifikant, was durch die starke individuelle Streuung der Werte bedingt ist.
Im Gegensatz dazu ist der Anstieg des Noradrenalins im Plasma signifikant. Der Kontrollwert am Morgen des Operationstages beträgt 3,4 ng/ml. Er steigt auf 7,4 ng/ml am Ende der Operation. Danach fällt das NA auf 4,9 und 2,9 ng/ml ab. Am Abend des Operationstages steigt es wieder auf 5,9 ng/ml an.
Die A- und NA-Konzentration im Plasma der Kinder zeigt vor, während und nach der Operation nur geringe, nicht signifikante Schwankungen.

Die A- und NA-Plasmakonzentrationen der Säuglinge vor und nach der Operation, verglichen mit den entsprechenden Daten der Kinder, ergeben keine signifikanten Unterschiede. Dagegen liegen die intra operationem gemessenen Werte der Säuglinge signifikant höher als die der Kinder ($2p < 0,01$).

3. Diskussion

In dem Abschnitt über die Besonderheiten in der Neugeborenenperiode wurde bereits auf die erhöhte Reaktionsbereitschaft des adreno-sympathischen Systems bei Neugeborenen eingegangen. Diese Eigenschaft ist offensichtlich nicht nur auf die ersten Lebenstage beschränkt, sondern bleibt über das erste Lebensjahr erhalten und klingt in dieser Zeit

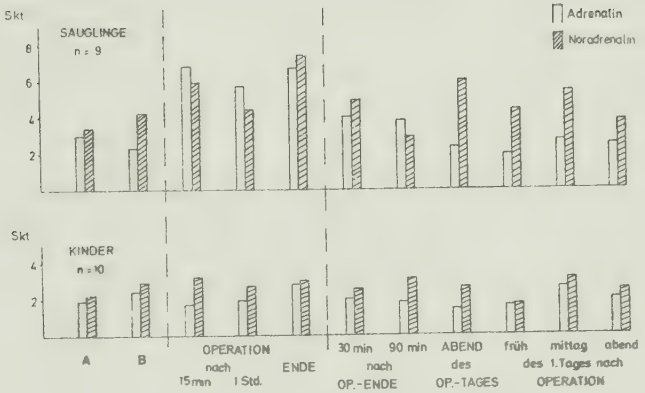

Abb. 16: Mittelwerte der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen im Plasma von Säuglingen und Kindern vor, während und nach Operationen. A = Werte am Morgen des Operationstages, B = Werte in Narkose.

langsam ab.

Die vorliegenden Messungen zeigen, daß die Säuglinge in Ruhe höhere Katecholamin-Konzentrationen besitzen als die größeren Kinder und daß im Operationsstress bei ihnen höhere A- und NA-Plasmaspiegel vorliegen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen ferner, daß unter der Praemedikation (Bellafolin[1]) bei den Säuglingen und Atropin bei den älteren Kindern) und unter einer Fluothan[2])-Lachgas-Narkose die Katecholamine nicht ansteigen. Das deckt sich mit den Angaben in der Literatur (36,38,77).

Intraoperativ und in der frühen postoperativen Phase werden bei den Säuglingen z.T. höhere A- als NA-Konzentrationen gefunden. Ähnliche Beobachtungen machte CHEEK (16) beim Membransyndrom der Neugeborenen. Er fand ebenfalls höhere A- als NA-Werte im Plasma.

1) Bellafolin = l-Hyoscyamin, Fa. Sandoz
2) Fluothan = 2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluoraethan, Fa. Rhein-Pharma

Bei den älteren Kindern werden die Katecholamin-Plasmaspiegel durch die Operation nicht beeinflußt. Das stimmt mit dem Befund überein, daß bei Erwachsenen während großer Operationen die Katecholamin-Plasmaspiegel oder die Katecholaminausscheidung im Urin nicht ansteigen (36,38,43,48). Nur bei großen thoraxchirurgischen Eingriffen unter Einsatz des extrakorporalen Kreislaufes und unter Hypothermie wurde eine vermehrte Katecholaminausscheidung gemessen. Demnach verhalten sich Kinder nach dem ersten Lebensjahr hinsichtlich der adreno-sympathischen Reaktion bereits wie Erwachsene.
Die Katecholaminausscheidung kann bei schweren septischen Prozessen im frühen Lebensalter erhöht, vermindert oder normal sein (61), während sie bei Erwachsenen durchweg erhöht ist (37). Der junge Organismus kann auf unkomplizierte rezidivierende Stressituationen auch wiederholt mit einer Katecholaminausschüttung reagieren (38). Ein unmittelbarer Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit Befunden der Literatur ist wegen der unterschiedlichen Nachweismethoden und [illegible] sonst verschiedenen Bedingungen nicht ohne weiteres möglich. Die Werte besonders für das A liegen bei der Bestimmung im zentralvenösen Blut höher als die mehr oder weniger peripher gewonnenen Werte z.B. von CHEEK (16).
Die Ursache der unterschiedlichen adreno-sympathischen Reaktion auf den Operationsstress bei Säuglingen und Kindern sehen wir darin, daß Säuglinge eine etwa doppelt so hohe Metabolisationsrate besitzen wie Erwachsene.
Bekanntlich steuert A u.a. den Glucose- und Fettstoffwechsel und erhöht den O_2-Verbrauch. Ein höherer Ausgangsspiegel oder eine höhere Ruhesekretion ist demnach notwendig. Gleichzeitig besitzt der Säugling dadurch eine höhere Reaktionsbereitschaft, die sich in einem signifikant stärkeren Anstieg der Plasmaspiegel ausdrückt, wobei wir jedoch voraussetzen, daß die Elimination nicht gestört ist.
NA hat über seine Herz- und Kreislaufwirkungen und die damit verbundene Thermoregulation einen indirekten Einfluß auf den Stoffwechsel.
Aus den vorliegenden Meßdaten kann geschlossen werden, daß

der Organismus in der frühesten Lebensperiode durch die vermehrte Freisetzung von A und NA über ein außerordentlich schnell reagierendes und schnell wirksames Regulationssystem verfügt, um die Homöostase aufrechtzuerhalten oder wiederherzustellen.

VII. Zusammenfassung

Katecholamine spielen möglicherweise bei der Anpassung der Neugeborenen an extrauterine Bedingungen eine wesentliche Rolle, wie eine einleitend gegebene Übersicht über die Physiologie und Pathophysiologie zeigt. Eine Bestimmung der Katecholamine - die verschiedenen Methoden werden dargestellt - ist bisher bei Neugeborenen wegen der dafür benötigten Plasmavolumina kaum möglich gewesen.
Es wird hier eine Methode zur Bestimmung von Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) in kleinen Plasmavolumina beschrieben. A und NA werden als Trihydroxyindole nachgewiesen.

Die Empfindlichkeit beträgt 0,03 ng A und 0,02 ng NA pro Milliliter, die [illegible] (n = 9) und für NA 56,4 ± 11,6 % (n = 12).
Der höchste Verlust tritt mit 28% beim Enteiweißen auf. Weitere Verluste ergeben sich beim Neutralisieren und bei der Säulenpassage.
Der "faded blank" gibt wegen der Eigenfluoreszenz des AG 50 W - X8 falsch positive Ergebnisse. Deshalb wurde der nicht oxydierte Leerwert verwendet, der diesen Fehler nicht gibt.

Darüberhinaus wurden die Eigenschaften von drei Kationenaustauscherharzen, jedes aus einer anderen Grundsubstanz, in Bezug auf die Verwendung bei Fluoreszenzmethoden bestimmt. AG 50W - X8, minus 400 mesh, war der brauchbarste für die Katecholaminbestimmung. Bio-Rex 70 ist ein Harz aus nicht fluoreszierender Grundsubstanz.
Mit der Zugabe von Cu^{++} zum Meßwert wird die Fluoreszenz stabilisiert und man erhält eine größere Ausbeute an Fluoreszenz.

Ferner addieren sich damit die Fluoreszenzanteile von A und NA. Die Wirkung der Cu^{++} beruht wahrscheinlich auf einer Absättigung der Glasoberflächen, wodurch die Adsorption der Lutine verhindert wird.
Die Fluoreszenzcharakteristika von A und NA sind mit und ohne Cu^{++} identisch. DOPA und Dopamin geben unter den Bedingungen der Methode keine bzw. nur eine geringe Fluoreszenz. Die Methode ist damit für A und NA spezifisch.

Vor, während und nach chirurgischen Eingriffen werden bei neun Säuglingen und bei zehn Kindern die A- und NA-[illegible] bestimmt. Die Säuglinge haben höhere A- und NA-Konzentrationen im Plasma als die Kinder. Intraoperativ steigen die Werte für A und NA bei den Säuglingen stärker an als bei den Kindern. Dieser Befund wird diskutiert.

Ich bedanke mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Hollmann [illegible] und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.
Frl. R. [illegible] für die technische Hilfe.

VIII. Literaturverzeichnis

1. AHLQUIST, P.R.: A study of adrenotropic receptors. Amer. J. Physiol. 153, 586. 1948
2. ARONOW, L., F.A. HOWARD: Improved fluorimetric technique to measure changes in adrenal epinephrine-norepinephrine output caused by veratrum alkaloids. Fed. Proc. 14, 315. 1955
3. AXELROD, J.: Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines. Physiol. Rev. 39, 751. 1959
4. AXELROD, J., R. TOMCHICK: Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J. Biol. Chem. 233, 702. 1958
5. BERTLER, A., A. CARLSSON, E. ROSENGREN: A method for the fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in tissues. Acta physiol. scand. 44, 273.1958
6. BIRD, L.H.: New Zealand J. Sci. Technol. 303, 334. 1949 Zitiert nach (88) S. 101
7. BLASCHKO, H., J.M. HAGEN, P. HAGEN: Mitochondrial enzymes and chromaffin granules. J. Physiol. 134, 316. 1957
8. BLASCHKO, H., D. RICHTER, H.J. SCHLOSSMAN: Inactivation of adrenaline. J. Physiol. (Lond.) 90, 1. 1937
9. BLEYL, U., C.M. BÜSING, B. KREMPIEN: Pulmonale hyaline Membranen und perinataler Kreislaufschock. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 348, 187. 1969
10. BORN, G.V.R., G.S. DAWES, J.C. MOTT: The viability of premature lambs. J. Physiol. 130, 191. 1955
11. BORN, G.V.R., G.S. DAWES, J.C. MOTT, B.R. RENNICK: The constriction of the ductus arteriosus caused by oxygen and by asphyxia in newborn lambs. J. Physiol. 132, 304. 1956
12. BU'LOCK, J., J. HARLEY-MASON: The chemistry of adrenochrome. Part II: Some analogues and derivatives. J. chem. Soc. 712. 1951
13. BURGER, M.: Veränderungen der Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen im menschlichen Blutplasma unter

Reserpin. Arch. exper. Path. u. Pharmak. 230, 489. 1957

14. BURN, G.P., E.O. FIELD: Fluorescence of adrenaline and noradrenaline with ethylendiamine. Nature (Lond.) 178, 542. 1956

15. BYRNE, J.J.: Current concepts: shock. New England J. Med. 275, 543. 1966

16. CHEEK, D.B., M. MALINEK, J.M. FRAILLON: Plasma adrenaline in the neonatal period, and infants with respiratory distress syndrome and placental insufficiency. Pediatrics 31, 374. 1963

17. CHEEK, D.B., R.D. ROWE: Aspects of sympathetic activity in the newborn, including the respiratory distress syndrome. Pediat. Clin. North Amer. 13, 863. 1966

18. COHAN, G., M. GOLDENBERG: The simultaneous fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in plasma I. The fluorescence characteristics of adrenolutine and noradrenolutine and their simultaneous determination in mixtures. J. Neurochem. 2, 58. 1957

19. COHAN, G., M. GOLDENBERG: The simultaneous fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in plasma II. Peripheral venous plasma concentrations in normal subjects and in patients with phaeochromocytoma. J. Neurochem. 2, 71. 1957

20. CRAWFORD, T.B.B., A.S. CRAIGHORN: The quantitative separation of adrenaline and noradrenaline in biological fluids and tissue extracts. Brit. J. Pharmacol. 6, 8. 1951

21. DOUGLAS, W.W., R.P.RUBIN: Role of calcium in secretory response of adrenal medulla to acetylcholine. J. Physiol. 159, 40. 1961

22. EHRLÉN, T.: Fluorimetric determination of adrenaline. Farm. Rev. (Stockh.) 47, 242. 1948

23. ENDE, D., G. HOLLMANN: Nachweis von Adrenalin und Noradrenalin in kleinen Blutvolumina. Z. klin. Chem. u. Biochem. 8, 77. 1970

24. EULER, U.S., von: The development and applications of the trihydroxyindole method for catecholamines. Pharmacol. Rev. 11, 262. 1959
25. EULER, U.S., von: The catecholamines. Adrenaline, noradrenaline, in: Hormones in blood, C.H.GRAY, Academic Press 1961
26. EULER, U.S., von, I. FLODING, F. LISHAJKO: The presence of free and conjugated 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (dopac) in urine and blood plasma. Acta Soc. Med. upsalien. 64, 217. 1959
27. FISCHER, P.: Sur la substance responsable de la fluorescence de l'adrenaline. Bull. Soc. chim. Belg. 58, 205. 1949
28. GADDUM, J.H., F. LEMBECK: The assay of substances from the adrenal medulla. Brit. J. Pharmacol. 4, 401. 1949
29. GOLDFIEN, A., W.F. GANONG, B. WISE: Specific neural stimulation of norepinephrine secretion by the adrenal medulla during anoxia. J. Clin. Invest. 40, 1043. 1961
30. GOODALL, McC., W.R. HARLAN Jr., H. ALTON: Noradrenaline release and metabolism in orthostatic (postural) hypotension. Circulation 36, 489. 1967
31. GREENBERG, R.E., J. LIND: Catecholamines in tissue of the human fetus. Pediatrics 27, 904. 1961
32. GREENBERG, R.E., J. LIND, U.S. von EULER: Effect of posture and insulin hypoglycemia on catecholamine excretion in the newborn. Acta Pediat. 49, 780. 1960
33. GUGLER, R. R. KNUPPEN, H. BREUER: Reinigung und Charakterisierung einer S-Adenosyl-Methionin : Catechol-O-Methyltransferase der menschlichen Placenta. Biochim. Biophys. Acta 220, 10. 1970
34. HÄGGENDAL, J.: On the use of strong exchange resins for determinations of small amounts of catechol amines. Scand. J. Clin.&Lab. Invest. 14, 537. 1962
35. HÄGGENDAL, J.: An improved method for fluorimetric determination of small amounts of adrenaline and noradrenaline in plasma and tissues. Acta physiol. scand. 59, 242. 1963

36. HAMMOND, W.G., L. ARONOW, F.D.MOORE: Studies in surgical endocrinology: Plasmaconcentrations of epinephrine and norepinephrine in anesthesia, trauma and surgery as measured by a modification of the method of Weil-Malherbe and Bone. Ann. surg. 144, 715. 1956

37. HARDAWAY, R.M., P.M. JAMES, R.W. ANDERSON, C.E.BREDENBERG: Intensive study and treatment of shock in man. J. Amer. Med. Ass. 199, 779. 1967

38. HARDY, T.D., M.D. TURNER, T. CARTER: Catecholamine metabolism: Peripheral plasma levels of epinephrine and norepinephrine during laparotomy and different types of anesthesia in dogs, during operation in man (including adrenal vein sampling) and before and following resection of a pheochromocytoma associated with von Recklinghausen's neurofibromatosis. Ann. Surg. 150, 666. 1959

39. HARLEY-MASON, J.: The chemistry of adrenochrome and its derivatives. J. chem. Soc. 1276. 1950

40. HARRISON, T.S., J. SEATON: The relative effects of hypoxia and hypercarbia on adrenal medullary secretion in anaesthetized dogs. J. Surg. Res. 5, 560. 1965

41. [illegible]ELNER, O.M.: Estimation of urinary catecholamines by means of a strip of rabbit aorta as an aid in the diagnosis of pheochromocytoma. J. Lab. Clin. Med. 50, 737. 1957

42. [illegible]E[illegible]R, E.F. v.: Über eine einfache Methode Adrenalin im strömenden Blut nachzuweisen. Klin. Wschr. 19, 864. 1940

43. [illegible]NDEGLIA, R.A., M.I. LEVY, R.C. LILL[illegible]I, D.B. TODD, W.C.[illegible]IEHNI: Correlation of plasma catecholamines, [illegible] patients undergoing corrective surgery. J. Thor. Cardiov. Surg. 51, 244. 1966

44. IVANHOE, F.: Letter to the editor. Pediatrics 36, 451 1965

45. JOLY, L.P., G. NADEAU: Evidence of side-chain cleavage

during the reaction of epinephrine and norepinephrine with ethylene diamine. Nature (Lond.) 184, 1483. 1959

46. KAINDL, F., U.S. EULER, von: Liberation of nor-adrenaline and adrenaline from the suprarenals of the cat during carotid occlusion. Amer. J. Physiol. 166, 284. 1951

47. KEUTH, U.: Therapie des Membransyndroms beim Früh- und Neugeborenen. Mschr. Kinderheilk. 116, 598. 1968

48. KONRAD, R.M., I.HAASE, W. STAIB: Die Katecholaminausscheidung nach thoraxchirurgischen Eingriffen. Zbl. Chir. 15, 473. 1969

49. KOPIN, I.J.: Storage and metabolism of catecholamines: role of monoamine oxidase. Pharmacol. Rev. 16, 179. 1964

50. KOPIN, I.J., E.K. GORDON: Origin of norepinephrine in heart. Nature (Lond.) 199, 1289. 1963

51. LEHMANN, G., H.F. MICHAELIS: Adrenalin und Arbeit, II. Mitteilung. Der normale Adrenalingehalt des Blutes. Arbeitsphysiologie 12, 264. 1943

52. LIGHT, I.J., J.M. SUTHERLAND, J.N.LOGGIS, Th.E. GAFFNEY: Impaired epinephrine release in hypoglycemic infants. New Engl. J. Med. 277, 394. 1967

53. LILLEHEI, R.C., J.K. LONGERBEAM, J.H. BLOCH, W.G. MANAX: The modern treatment of shock based on physiologic principles. Clin. Pharmacol. Ther. 5, 63. 1964

54. LOEW, C.: Über die Natur der Giftwirkung des Suprarenins. Biochem. Z. 85, 295. 1918

55. LUND A.: Fluorimetric determination of adrenaline in blood. I. Isolation of the fluorescent oxidation product of adrenaline. Acta pharmacol. et toxicol. 5, 75 1949

56. LUND, A.: Fluorimetric determination of adrenaline in blood. II. The chemical constitution of adrenolutine (the fluorescent oxidation product of adrenaline). Acta pharmacol. et toxicol. 5, 121. 1949

57. LUND, A.: Fluorimetric determination of adrenaline in blood. III. A new sensitive and specific method.

Acta pharmacol. et toxicol. 5, 231. 1949

58. LUND, A.: Simultaneous fluorimetric determinations of adrenaline and noradrenaline in blood. Acta pharmacol. et toxicol. 6, 137. 1950
59. LYNCH, M.J., L.D. MELLOR, A.R. BADGERY: Hyaline membrane disease: Its nature and etiology. J. Pediat. 48, 602. 1956
60. MANGAN, G.F., Jr., J.W. MASON: Fluorescence of ethylenediamine derivatives of epinephrine and norepinephrine. Science 126, 562, 1957
61. MIGEON, C.J., F.M. KENNY, W. HUNG, M.L. VOORHESS: Study of adrenal function in children with meningitis. Pediatrics 40, 163. 1967
62. MOORE, S., D.H. SPACKMAN, W.H. STEIN: Chromatography of amino acids on sulfonated polysterene resins. Anal. Chem. 30, 1185. 1958
63. MORRIS, M.E., A.R. MILLAR: Blood pH/plasma catecholamine relationships: Respiratory acidosis. Brit. J. Anesthesiol. 34, 672. 1962
64. NADEAU, G., L.P. JOLY: Fluorescent derivatives obtained by the reaction of ethylene diamine with epinephrine and norepinephrine. Nature (Lond.) 182, 180. 1958
65. NADEAU, G., L.P. JOLY, G. SOBOLEWSKI: Influence of metallic ions on the reaction of ethylene diamine with epinephrine and norepinephrine. Nature (Lond.) 181, 1061. 1958
66. NAEYE, R.L., H.T. HARCKE, W.A. BLANC: Adrenal gland structure and the development of hyaline membrane disease. Pediatrics 47, 650. 1971
67. NATELSON, S., J.K. LUGOVOY, J.B. PINCUS: New fluorimetric method for the determination of epinephrine. Arch. Biochem. 23, 157. 1949
68. NICOLOPOULOS, D., A. AGATHOPOULOS, C. DANELATOU-ATHANASSIADOU, M. BAFATAKI: Urinary excretion of phenolic and indolic compounds, metacatecholamines, and VMA by full-term and premature infants. Pediatrics

41, 777. 1968

69. NICOLOPOULOS, D., A. AGATHOPOULOS, M. GALANAKOS-THAROUNIATI, C. STERGIOPOULOS: Urinary excretion of catecholamines by full-term and premature infants. Pediatrics 44, 262. 1969

70. O'HANLON, J.F., Jr., H.C. CAMPUZANO, S.M. HORVATH: A fluorometric assay for subnanogram concentrations of adrenaline and noradrenaline in plasma. Anal. Biochem. 34, 568. 1970

71. PAGET, M.: Nouvelle réaction colorée de l'adrenaline et de l'adrenalone. Bull. Sc. pharmacol. 37, 537. 1930

72. POTTER, L.T., J. AXELROD: Subcellular localization of catecholamines in tissues of rat. J. Pharmacol.&Exper. Therap. 142, 291. 1963

73. PRICE, H.L., H.W. LINDE, M.L. PRICE: Failure of ethylene diamine condensation method to detect increased plasma norepinephrine concentrations during general anesthesia in man. Clin. Pharm. Ther. 1, 298. 1960

74. PRICE, H.L., M.L. PRICE: The chemical estimation of epinephrine and norepinephrine in human and canine plasma. II A critique of the trihydroxyindole method. J. Lab. clin. Med. 50, 769. 1957

75. RAVENTOS, J.: Action of fluothane - a new volatile anesthesia. Brit J. Pharm. 11, 394. 1956

76. RENNICK, B., N. YOSS: Renal tubular excretion of dl-epinephrine-2-C14 in chicken. J. Pharmacol.&Exper. Therap. 138, 347. 1962

77. RICHARDSON, J.A., E.F. WOODS, A.K. RICHARDSON: Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine during anaesthesia. J. Pharmacol. 119, 378. 1957

78. RICHTER, D.: Adrenaline and amine oxidase. Biochem. J. 31, 2022. 1937

79. SCHIFF, D.L., L. STERN, J. LEDUC: Chemical thermogenesis in newborn infants: Catecholamine excretion and the plasma non-esterified fatty acid response to cold exposure. Pediatrics 37, 577. 1966

80. SHAW, F.H.: The estimation of adrenaline. Biochem. J. 32, 19. 1938
81. SOURKES, T.L., G.F. MURPHY: Determination of catecholamines and catecholamino acids by differential spectrophotofluorimetry. Meth. med. Res. 9, 147. 1961
82. STERN, L., R.E. GREENBERG, J. LIND: Catecholamine excretion in the newborn period: Effect of short periods of induced hypoxia. Acta Pediat. 50, 497. 1961
83. STERN, L., J. LEDUC, J. LIND: Hypoxia as a stimulus to catecholamine excretion in the newborn infant. II. The effect of exposure to 10% O_2. Acta Pediat. 53, 13. 1964
84. STERN, L., M.H. LEES, J. LEDUC: Environmental temperature, oxygen consumption, and catecholamine excretion in newborn infants. Pediatrics 36, 367. 1965
85. STERN, L., E.W. OUTERBRIDGE, J. LEDUC: Urinary catecholamine levels in infants with hyaline membrane disease. Vortrag in Wien 1970, Pädiatriekongreß
86. 1. Symposium on catecholamines. Pharmacol. Rev. 11, 233. 1959
87. 2. Symposium on catecholamines. Pharmacol. Rev. 18, 29. 1966
88. UDENFRIEND, S.: Fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, New York, London 1962
89. VALK, A. de T., Jr., H.L. PRICE: Chemical estimation of epinephrine and norepinephrine in human and canine plasma: Critique of the ethylene-diamine condensation method. J. Clin. Invest. 35, 837. 1956
90. VALORI, C., BRUNORI, C.A., V. RENZINI, L. COREA: Improved procedure for formation of epinephrine and norepinephrine fluorophors by the trihydroxyindole reaction. Anal. Biochem. 33, 158. 1970
91. VENDSALU, A.: Studies on adrenaline and noradrenaline in human plasma. Acta physiol. scand. 49, suppl. 173. 1960
92. VOORHESS, M.L.: Urinary catecholamine excretion by healthy children. Pediatrics 39, 252. 1967

93. WEIL-MALHERBE, H.: The fluorimetric estimation of catecholamines. Meth. med. Res. 9, 130. 1961
94. WEIL-MALHERBE, H., J. AXELROD, R. TOMCHICK: Blood-brain barrier for adrenaline. Science 129, 1226. 1959
95. WEIL-MALHERBE, H., L.B. BIGELOW: The fluorometric estimation of epinephrine and norepinehrine: An improved modification of the trihydroxyindole method. Anal. Biochem. 22, 321. 1968
96. WEIL-MALHERBE, H., A.D. BONE: Chemical estimation of adrenaline-like substances in blood. Biochem. J. 51, 311. 1952
97. WURTMAN, R.J.: Catecholamines. New England J. Med. 273, 637. 1965
98. YAGI, K., T. NAGATSU: Condensation products of ethylenediamine with adrenaline. Nature (Lond.) 183, 822. 1959
99. YOUNG, J.G., R.L. FISCHER: Reaction of epinephrine with ethylenediamine. Science 127, 1390. 1958

IX. Lebenslauf

Am 23. März 1943 wurde ich als erster Sohn des Montagemeisters Hans Grübl und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Brosek, in Gotha geboren. An der Maria - Theresia Oberrealschule in München legte ich im Herbst 1963 das Abitur ab. Nach dem Wehrdienst begann ich im Herbst 1965 das Medizinstudium an der Universität München. Im Frühjahr 1968 machte ich das Physikum. Im Juni 1971 schloß ich das Studium in München mit dem Staatsexamen ab. Seit dem 25.9.1970 bin ich mit der Medizinalassistentin Ingeborg Grübl, geb. Keller, verheiratet. Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent an der Kinderchirurgischen Klinik der Universität München.